

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Козлов Евгений Максимович

**Оценка профиля сенсибилизации к молекулярным аллергенам
Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Can f 5, Can f 6 у пациентов с аллергией
на собаку**

3.2.7. Иммунология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН

Караулов Александр Викторович

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Основные понятия аллергологии	16
1.2. Аллергия на собак. Описание, эпидемиология.....	18
1.3. Этиология, патогенез и клинические проявления аллергии на собак	20
1.4. Врожденный иммунитет в контексте аллергических заболеваний	22
1.5. Современные представления о системе адаптивного иммунитета.....	24
1.6. Патоиммунологические основы реакций гиперчувствительности.....	27
1.6.1. Реакция гиперчувствительности немедленного/ анафилактического типа	28
1.6.2. Реакция гиперчувствительности II типа/антителоопосредованная	31
1.6.3. Реакция гиперчувствительности III типа/иммунокомплексная патология	32
1.6.4. Реакция гиперчувствительности IV типа/замедленный тип реакций	33
1.7. Компонентная диагностика в молекулярной аллергологии	34
1.8. Характеристика молекулярных алергокомпонентов собак.....	38
1.8.1. Семейство липокалинов.....	40
1.8.2. Семейство сывороточных альбуминов.....	42
1.8.3. Семейство калликреинов	43
1.8.4. Минорные алергены собак.....	44
1.9. Метод ImmunoCAP для диагностики аллергии на собак.....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	47
2.1. Дизайн исследования	47
2.2. Реактивы и материалы используемые в исследовании	49
2.3. Бактериальные штаммы и плазмидные векторы	50
2.4. Лабораторное оборудование.....	51
2.5. Образцы сывороток пациентов с аллергией на собаку	51

2.6. Разработка штаммов продуцентов <i>E. coli</i> несущие целевые гены Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 6	52
2.7. Разработка штаммов продуцентов <i>E. coli</i> несущие целевые гены Can f 5	56
2.8. Экспрессирование рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6	58
2.9. Оценка реактивности аллерген-специфических IgE-антител человека к Can f 5 с помощью Вестерн-блоттинга.....	59
2.10. Получение Can f 3 в нативной форме	60
2.11. Определение вторичной структуры аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6	61
2.12. Анализ дегрануляции базофилов	61
2.13. Анализ ингибирования IgE методом иммуноферментного анализа	62
2.14. Биотинилирование полной панели рекомбинантных аллергенов Can f 1 - Can f 6	63
2.15. Оценка профиля сенсибилизации к молекулярным аллергенам Can f 1 – Can f 6 у пациентов с аллергией на собаку	64
2.16. Методы статистической обработки результатов исследования.....	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	66
3.1. Разработка штаммов продуцентов аллергенных компонентов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6	68
3.2. Получение и характеристика рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4 и Can f 6	72
3.3. Разработка, получение и характеристика рекомбинантного Can f 5.....	80
3.4. Анализ дегрануляции базофилов аллергенов Can f 1 - Can f 6	91
3.5. Ингибирование CCD-производных Can f 5, полученного в дрожжевой системе экспрессии методом иммуноферментного анализа.....	93
3.6. Оценка профиля сенсибилизации к молекулярным аллергенам собаки Can f 1 - Can f 6 у пациентов с аллергией на собаку	95
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	104

ВЫВОДЫ	106
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	107
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	111

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Распространенность сенсibilизации к аллергенам собак имеет восходящую тенденцию в мире, являясь социально значимой проблемой. По оценкам, до 30% взрослого населения, проживающего в Европе, обращаются в больницу с подозрением на аллергию на собак. Собаки являются одними из самых распространенных домашних животных, поскольку они способствуют поддержанию ментального здоровья человека, улучшая настроение и самочувствие, уменьшают уровень стресса. Однако распространение собак в качестве домашних животных также связано с увеличением концентрации аллергенов как непосредственно в местах их обитания, так и за их пределами. Например, зафиксировано увеличение концентрации аллергенов в школах, на рабочих местах, общественных пространствах, а также в домах, где домашние животные не содержатся. Таким образом, количество регистрируемых случаев аллергии на собаку в развитых странах возрастает. Симптомы и выраженность аллергии на собак весьма гетерогенны и проявляются от слабовыраженных местных реакций до жизнеугрожающих состояний. Увеличение регистрируемых случаев эпидермальной аллергии требует скорейшего развития продвинутых диагностических методов, а также современных методов лечения и профилактики.

В Российской Федерации наиболее распространенными диагностическими методами установления этиологического агента аллергии являются кожные аллергологические тесты, для выполнения которых используют экстракты аллергенов. Природные экстракты представляют собой гетерогенные источники с значительной вариативностью представленности отдельных аллергенов в экстракте. Они содержат большой набор примесных компонентов неизвестного состава, что значительно снижает точность диагностики. Как известно, натуральные эпидермальные экстракты склонны давать ложноположительные результаты из-за феномена кросс-реактивности между гомологичными

семействами аллергенов. Таким образом, хотя кожные алергопробы являются эффективным методом диагностики аллергии, они не позволяют выявить конкретный аллерген, к которому сенсibilизированы пациенты, из-за характерной для них вариабельности.

С развитием молекулярной алергологии и компонентной диагностики аллергии стало возможно анализировать IgE-специфические антитела к определенным молекулам аллергенов из различных источников. Понимание к каким именно аллергенам сенсibilизированы пациенты, позволяет не только диагностировать алергические заболевания, но и изучать характерные паттерны сенсibilизации, выявляя мультисенсibilизацию и кросс-реакции. Более того, в клинической практике особенно важно оценивать риски развития алергических реакций тяжелого течения и предвидеть внезапные реакции. Отдельно стоит отметить, что изучение распространенности сенсibilизации позволяет создавать панели аллергенов, характерные для определенной географической зоны, что удешевляет стоимость диагностики. Кроме того, это дает возможность разрабатывать специфические методы иммунотерапии для профилактики алергических заболеваний.

На сегодняшний день известно 6 основных аллергенов собак – Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Can f 5 и Can f 6. Каждый из аллергенов может проявлять свои уникальные паттерны сенсibilизации у пациентов, что может быть ассоциировано с различными клиническими симптомами. Для создания диагностических тестов, оценивающих сенсibilизацию к аллергенам собак, необходима разработка эффективных протоколов получения рекомбинантных высокоочищенных молекул с нативной структурой и известными свойствами. Полностью охарактеризованные молекулы с аналогичными натуральным алергенными свойствами могут быть использованы для комплексной диагностики аллергии на собаку. Таким образом, оценка профиля сенсibilизации к панели рекомбинантных аллергенов собаки Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Can f 5, Can f 6 позволит выявить наиболее клинически значимые молекулы аллергии на собаку, что улучшит текущие диагностические протоколы, а также создаст предпосылки для разработки новых терапевтических подходов лечения аллергии на собаку.

Степень разработанности темы исследования

На данный момент существует ограниченное количество исследований, посвященных профилям сенсibilизации пациентов к аллергенам собак. В общей сложности известно 8 основных работ, посвящённые данной теме. Одним из значимых исследований является работа Eidukaite A. et al., в которой была проведена оценка паттернов сенсibilизации к аллергенам собак (Can f 1 – Can f 6) и кошек (Fel d 1, Fel d 2, Fel d 4, Fel d 7) в когорте пациентов Литвы, у которых наблюдались симптомы аллергии [68]. Исследование было выполнено с использованием метода ALEX2. Аналогичную работу провели Roger A. et al., исследуя профили сенсibilизации к аллергенам собак и кошек у пациентов из Испании с установленной сенсibilизацией с помощью метода ImmunoCAP [92].

В Российской Федерации представлено ограниченное количество исследований, посвященные оценке молекулярных профилей сенсibilизации к молекулярным аллергенам пушных животных, одна из которых является работа Жукалиной Е.Ф. и соавторов. В данном исследовании использовался метод аллергочипа ISAC, однако стоит отметить, что в нем не была оценена сенсibilизация к аллергенам Can f 4 и Can f 6 [6].

Работы Huang Z. et al. и Chen H. et al. исследовали сенсibilизацию к аллергенам собак (Can f 1 – Can f 5) в китайской когорте пациентов с использованием системы детекции EUROIMMUN. Однако данные исследования не включали аллерген Can f 6 [81,83].

Исследование Vachová M. et al. проводилось в Центральной Европе, и в нем оценивалась сенсibilизация к аллергенам собак, таким как Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 5, с помощью аллергочипа ISAC. Однако в данном исследовании также не были включены молекулы Can f 4 и Can f 6 [18].

Работы Villalta D. et al. и Ukleja-Sokołowska N. et al. в северо-восточной Италии проводили оценку частот аллергической сенсibilизации к молекулам Can f 1, Can f 2, Can f 3 и Can f 5 с использованием методов аллергочипа ISAC и ImmunoCAP соответственно [17, 39].

Настоящее исследование представляет собой комплексную оценку профилей сенсibilизации пациентов с аллергией на собак в Российской Федерации с использованием полной панели аллергенов собак (Can f 1 – Can f 6). В дополнение к этому, в рамках работы проводится оценка аллергенной активности *in vitro* с помощью анализа дегрануляции базофилов. Этот метод позволяет не только подтвердить наличие аллергической реакции к определенному аллергену, но и количественно оценить высвобождение медиаторов тучных клеток по активности β -гексозаминидазы, а также выявить минимальную концентрацию аллергена, при которой наблюдается высвобождение гранул из тучных клеток.

Цель и задачи исследования

Целью исследования является оценка профиля сенсibilизации к молекулярным аллергенам Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Can f 5, Can f 6 у пациентов с аллергией на собаку для выявления наиболее значимых алергокомпонентов.

Задачи исследования:

1. Получение штаммов-продуцентов *E. coli* экспрессирующие рекомбинантные аллергены Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5, Can f 6.
2. Создание и оптимизация протоколов получения рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5, Can f 6 в растворимой форме.
3. Охарактеризовать молекулярно-биологические свойства и аллергенную активность рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5, Can f 6.
4. Модифицировать молекулярные аллергены Can f 1 – Can f 6 с помощью биотиновой метки для возможности детекции аллерген-специфических антител с помощью иммунокэпов со стрептавидином.
5. Оценка IgE-реактивности сывороток пациентов с аллергией на собаку к панели молекулярных аллергенов Can f 1 – Can f 6 методом ImmunoCAP с целью определения диагностической значимости данных аллергенов.

Научная новизна

В настоящей работе были разработаны высокоэффективные протоколы для получения полной панели молекулярных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5, Can f 6 в растворимой форме, которая была использована для диагностики аллергии на собаку методом ImmunoCAP.

Впервые были получены варианты рекомбинантного калликреина собак (rCan f 5), позволяющие проводить экспрессию аллергена в клетках *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) в растворимой форме. Полученные варианты аллергена распознаются аллерген-специфическими антителами человека, связывая нативные молекулы Can f 5, но не демонстрируя реактивности к перекрестным углеводным детерминантам.

В работе была продемонстрирована аллергенная активность молекул Can f 1 – Can f 6 методом дегрануляции тучных клеток, что ранее не учитывалось в других схожих работах при оценке профилей сенсibilизации пациентов с аллергией на собаку.

Показаны наиболее значимые молекулы при аллергии на собаку, которые могут быть использованы для диагностических и иммунотерапевтических целей.

Теоретическая и практическая значимость работы

В данной работе проведена комплексная оценка аллергосенсibilизации пациентов к аллергенам собаки Can f 1 – Can f 6, а также изучена аллергенная активность данных аллергенов с использованием модели клеточной линии базофилов крысы, экспрессирующей высокоаффинный рецептор FcεRI к IgE.

Разработаны и оптимизированы высокоэффективные протоколы получения рекомбинантных аллергенов в растворимой форме с использованием экспрессионной системы *E. coli*. Это позволяет не только значительно упростить процесс очистки, но и обеспечивает экспрессию аллергенов с корректной пространственной структурой, необходимой для их биологической активности. Впервые предложен метод получения рекомбинантного Can f 5 в системе *E. coli* в

растворимой форме, что обеспечивает распознавание нативного Can f 5 аллерген-специфическими антителами, которые не связываются с перекрестно-реактивными углеводными детерминантами, что снижает вероятность ложноположительных реакций и повышает специфичность диагностики.

В ходе исследования выявлены наиболее клинически значимые аллергены для диагностики аллергии на собак. Разработанная панель аллергенов позволяет не только точно детектировать истинную сенсибилизацию к собакам, но и эффективно дифференцировать её от кросс-реактивности с другими эпидермальными аллергенами.

Практическая значимость работы заключается не только в усовершенствовании диагностики аллергии на собак, но и в создании новых подходов к аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ). На основе данных о ключевых аллергенах собаки могут быть определены аминокислотные последовательности пептидов, взаимодействующие с аллерген-специфическими антителами, что позволит разрабатывать перспективные алерговакцины для лечения и профилактики данного вида аллергии.

С учётом того, что аллергия на собак является одной из наиболее распространённых форм аллергических заболеваний в Российской Федерации, разработка высокочувствительных методов диагностики, а также новых стратегий профилактики и терапии, представляет собой актуальную научную и практическую задачу.

Методология и методы исследования

Методы, используемые в данной работе, соответствуют поставленной цели и задачам исследования. Набор пациентов с аллергией на собаку проводился Московским городским научно-практическим центром аллергологии и иммунологии ГБУЗ «Городская клиническая больница № 52». Для получения рекомбинантных аллергенов были использованы плазмиды предоставленные центром патофизиологии, инфектологии и иммунологии (институт патофизиологии и алергоисследований) Венского медицинского университета

(заведующий лаборатории – профессор Рудольф Валента, иностранный член академии РАН). Экспрессирование рекомбинантных аллергенов проводилось в клетках *Escherichia coli*. Полученные рекомбинантные аллергены были охарактеризованы методами электрофореза в полиакриламидной геле (ПААГ), вестерн-блот анализа, спектроскопии кругового дихроизма, масс-спектрометрии и анализа дегрануляции базофилов. Экспериментальную часть работы проводили на базе лаборатории иммунопатологии Института молекулярной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) под руководством заведующего лабораторией, д.м.н., профессора, академика РАН Караулова Александра Викторовича. Полученную панель аллергенов биотинилировали и использовали для оценки сенсibilизации пациентов на молекулы Can f 1 – Can f 6 методом ImmunoCAP.

Личный вклад автора

Автором лично разработан план исследования аллергической сенсibilизации к основным аллергенам собаки (Can f 1 – Can f 6), включающая как клиническую, так и лабораторную оценку специфического иммунного ответа. Автор самостоятельно провел анализ литературных данных по теме исследования, обосновал актуальность исследования и сформулировал его цели и задачи.

В рамках работы автором были разработаны и оптимизированы протоколы получения рекомбинантных аллергенов в системе *E. coli*, обеспечивающие их экспрессию в растворимой форме с сохранением корректной пространственной структуры. Впервые был предложен метод получения рекомбинантного Can f 5 без включения кросс-реактивных углеводных детерминант, что повысило специфичность диагностики и снизило риск ложноположительных реакций.

Автор самостоятельно провел эксперименты по изучению аллергической активности рекомбинантных аллергенов, используя модель клеточной линии базофилов крысы, экспрессирующей высокоаффинный рецептор FcεRI.

Полученные результаты позволили выявить аллергены с наибольшей аллергенной активностью для диагностики аллергии на собак.

Автором разработана панель рекомбинантных аллергенов для дифференциальной диагностики истинной аллергии на собак и кросс-реактивности с другими эпидермальными аллергенами. Кроме того, результаты работы представляют перспективу для разработки новых методов иммунотерапии на основе изученных аллергенов.

Все этапы исследования, включая планирование, проведение экспериментов, анализ и интерпретацию полученных данных, а также написание научных статей и подготовку диссертации, выполнены автором лично или при его непосредственном участии. Основные результаты исследования были доложены на научных конференциях и опубликованы в рецензируемых журналах.

Положения, выносимые на защиту

1. Получены и охарактеризованы штаммы-продуценты *E. coli*, экспрессирующие рекомбинантные аллергены Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5, Can f 6, предназначенные для использования в диагностических тестах оценки аллергии на собак.

2. Разработан метод получения рекомбинантного простатического калликреина собак (Can f 5) в клетках *E. coli*, при котором не происходит включение перекрестно-реактивных углеводных детерминант в структуру молекулы, что снижает вероятность ложноположительных реакций и повышает специфичность диагностики.

3. Установлено, что аллергокомпоненты собак Can f 1, Can f 4 и Can f 5 обладают наибольшей аллергенной активностью.

4. Исследованы молекулярные профили сенсibilизации пациентов с аллергией на собак к аллергенам Can f 1 – Can f 6, среди которых Can f 1, Can f 4 и Can f 5 являются наиболее значимыми аллергенами.

5. Предложена роль простатического калликреина собак (Can f 5) в качестве маркера истинной аллергии на собак.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научная работа соответствует следующим направлениям исследований согласно паспорту научной специальности 3.2.7. Иммунология:

Область науки: 3. Медицинские науки;

Группа научных специальностей: 3.2. Профилактическая медицина;

Наименование отрасли науки, по которой присуждаются ученые степени;

Медицинские,

Биологические,

Ветеринарные

Шифр научной специальности: 3.2.7. Иммунология

Выполненная работа соответствует следующим направлениям исследования:

1. Фундаментальные исследования, посвященные изучению строения и функционирования иммунной системы, её онто- и филогенеза.

В данной работе изучены механизмы гиперчувствительности к аллергенам Can f 1 – Can f 6 у пациентов с аллергией на собак. Проведённый анализ позволил углубить понимание иммунологических реакций, лежащих в основе сенсibilизации к данным аллергенам.

2. Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии.

Исследование было направлено на изучение адаптивного иммунного ответа при аллергии на собак. Анализ иммунологических показателей позволил определить ключевые механизмы, участвующие в развитии аллергической реакции, что может быть использовано для разработки новых диагностических и терапевтических подходов.

3. Изучение патогенеза иммуноопосредованных заболеваний (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни).

В рамках исследования проведён анализ профилей сенсibilизации пациентов с аллергией на собак. Выявлены наиболее значимые аллергены, что

позволяет более точно диагностировать аллергию и разрабатывать персонализированные схемы терапии.

4. Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов.

Полученные результаты способствуют совершенствованию диагностики аллергии на собак. Определены ключевые аллергены, играющие ведущую роль в развитии заболевания, что может быть использовано при создании новых методов аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) и стратегий профилактики аллергии.

5. Разработка способов воздействия на иммунную систему с помощью фармакологических препаратов и методов иммунобиотерапии.

Данные исследования могут стать основой для создания инновационных фармакологических препаратов, направленных на специфическое лечение аллергии на собак.

Таким образом, выполненное исследование позволило углубить понимание механизмов аллергии на собак, выявить наиболее значимые аллергокомпоненты собак.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, которые соответствуют целям и поставленным задачам.

Апробация диссертационной работы состоялась 9 сентября 2025 г. на заседании кафедры клинической иммунологии и аллергологии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Основные положения диссертации доложены и обсуждены на профессиональных конгрессах с международным участием:

- Первый межрегиональный конгресс по аллергологии и иммунологии с международным участием (Москва, 2023);

- Первый межрегиональный конгресс по аллергологии и иммунологии с международным участием (Москва, 2024);

- Конференция LIFT 2025: Exploring Brain, Expanding Future с международным участием (Таруса, 2025);

- 19-й Конгресс Международного союза иммунобиологических обществ (IUIS) (Вена, 2025).

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 10 работ, в том числе 2 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета / Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 1 статья в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, 4 иных публикаций по результатам исследования, 1 патент, 2 публикации в сборниках материалов всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста, состоит из введения, глав обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Содержание работы проиллюстрировано 26 рисунками и 14 таблицами. Список литературы включает 101 источника, 9 из которых отечественные и 92 – зарубежные.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Основные понятия аллергологии

Аллергия – это реакция иммунной системы на чужеродное вещество, известное как аллерген, к которому большинство людей толерантны. У лиц, не имеющих толерантности, аллергены могут вызывать активацию иммунной системы, вызывая ряд клинически значимых симптомов, таких как чихание, заложенность носа, покраснение и зуд глаз, слезотечение, кашель. Согласно данным Всемирной организации аллергологов (WAO), аллергия значится четвёртой по значимости причиной хронических заболеваний в мире и, по оценкам исследователей, затрагивает до 30% населения [101]. Европейская федерация ассоциаций пациентов с аллергией и заболеваниями дыхательных путей (EFA) сообщает, что более 150 миллионов европейцев страдают хроническими аллергическими заболеваниями, такими как аллергический ринит, бронхиальная астма и экзема [89]. По разным оценкам, к 2025 году у более чем 50% европейцев будут диагностированы аллергии. Таким образом, наблюдается рост распространённости аллергических заболеваний, что требует совершенствования диагностических возможностей клинических специалистов.

Первые достижения в области аллергологии относятся к XX веку. В 1906 году Клеменс Пирке исследовал сывороточную болезнь и ввёл термин «аллергия», который первоначально обозначал чрезмерную реакцию иммунной системы на введение чужеродных белков [95]. В настоящее время Европейская академия аллергологии и клинической иммунологии (EAACI) определяет аллергию как реакцию гиперчувствительности, инициируемую иммунологическими механизмами [36]. Гиперчувствительность включает объективно воспроизводимые симптомы или признаки, возникающие при воздействии стимула в концентрации, к которой здоровый человек толерантен. Согласно современной номенклатуре, термин «гиперчувствительность» охватывает реакции, возникающие при контакте

с веществами, не вызывающими в норме иммунного ответа, а «аллергия» описывает широкий спектр клинических проявлений.

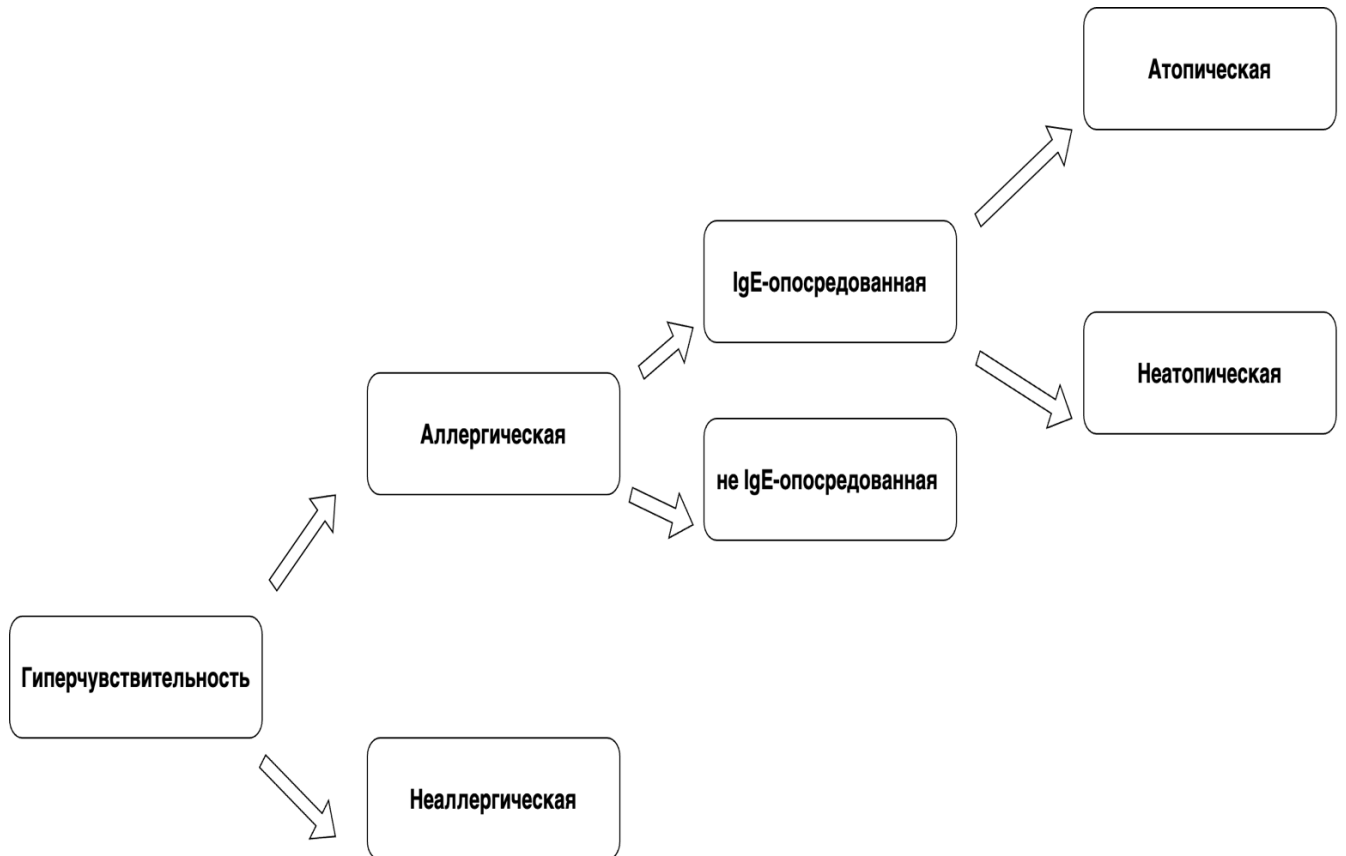


Рисунок 1 – Современная классификация гиперчувствительности

В представленной парадигме гиперчувствительность подразделяется на аллергическую и неаллергическую (рисунок 1). Аллергическая гиперчувствительность определяется неадекватным ответом иммунной системы в ответ на аллерген, когда явно отслеживается вовлечение иммунологических механизмов, тогда как при неаллергической гиперчувствительности такие доказательства могут отсутствовать.

Для обозначения предрасположенности к продукции аллерген-специфических иммуноглобулинов E (IgE) используется термин «атопия» [50]. Как правило, у пациентов с атопией развивается спектр атопических заболеваний, включая атопический дерматит, аллергический ринит и аллергическую астму.

Кроме того, в клинической практике выделяют псевдоаллергию – состояние, при котором наблюдаются реакции, клинически сходные с аллергическими, но без доказанной иммунологической природы. Псевдоаллергические реакции чаще всего

связаны с приемом лекарственных средств или продуктов, богатых биогенными аминами, такими как гистамин, серотонин и тирамин. Также они могут возникать в ответ на значительные стрессорные факторы или интенсивные физические нагрузки.

Известно, что между нервной и иммунной системами существует система обратной связи, обеспечивающая их двустороннюю регуляцию. Активация нейроэндокринной и симпатoadреналовой систем сопровождается высвобождением кортизола и катехоламинов, которые модулируют иммунные ответы на различных уровнях. В частности, хронический психоэмоциональный стресс в период гестации способен дезорганизовать иммунорегуляторные механизмы матери, что может способствовать повышению вероятности формирования atopического фенотипа у плода [85].

1.2. Аллергия на собак. Описание, эпидемиология

Аллергические реакции на собак представляет собой значимую медико-социальную проблему, ассоциированную с повышенным риском развития бронхиальной астмы и аллергического ринита. По данным Международного союза иммунологических обществ (МСИО, IUIS), на сегодняшний день зарегистрировано восемь молекулярных аллергенов, продуцируемые видом *Canis familiaris* [99]. Представленные алергокомпоненты, обладая высокой степенью представленности у собак, обнаруживаются в различных биологических субстратах собак, включая эпителий, слюну, мочу и сыворотку крови. Примечательно, что синтез аллергенов происходит вне зависимости от породы животного. В соответствии с их молекулярной структурой и биологической активностью выделены восемь ключевых компонентов, обозначаемых как Can f 1 – Can f 8 [99].

Аллергия к эпидермальным аллергенам собак является одной из ведущих причин формирования аллергических заболеваний дыхательных путей у детей, включая аллергический ринит и бронхиальную астму. Сенсибилизация к данным аллергенам характеризуется наличием специфических IgE-антител в сыворотке

крови и может выявляться у различных возрастных групп, охватывая до 30% популяции. При этом в ряде случаев клинические проявления могут отсутствовать, что свидетельствует о феномене субклинической или латентной сенсibilизации, детектируемой исключительно с помощью лабораторной диагностики. Особую значимость приобретает выявление IgE-антител, специфичных к отдельным молекулярным компонентам собак, ввиду нередкой встречаемости случаев моносенсibilизации. Кроме того, ряд белков вида *Canis familiaris* демонстрируют выраженные свойства перекрестной антигенной реактивности с аллергенами других видов млекопитающих, в частности, кошек, лошадей, а также с простатспецифическим антигеном человека (PSA) и некоторыми белками молока. Диагностические тесты на основе компонентной диагностики имеют принципиальное значение в контексте предупреждения тяжелых осложнений, связанных с аллергической бронхиальной астмой.

Домашние животные, в частности кошки и собаки, являются наиболее распространёнными домашними животными человека в глобальном масштабе. Согласно статистическим данным ресурса Statista, к 2023 году численность домашних собак превысила 470 миллионов, а кошек – 370 миллионов [90]. Аллергены этих животных обладают высокой степенью распространённости в окружающей среде и могут присутствовать не только в жилых домах, но и в местах массового пребывания людей – образовательных учреждениях, офисах, магазинах и других общественных пространствах. По данным Европейской федерации ассоциаций пациентов с аллергией и респираторными заболеваниями (EFA), именно аллергия на собак занимает лидирующие позиции по распространённости среди населения Европы [89]. В частности, более 27% взрослых европейцев, обращающихся за медицинской помощью по поводу аллергопатологии дыхательных путей, демонстрируют сенсibilизацию к эпидермальным аллергенам собак [27]. В последние годы наблюдается выраженная тенденция к увеличению числа пациентов с эпидермальными формами аллергии, что, вероятно, связано с ростом численности домашних животных, а также расширением контактов человека с сельскохозяйственными объектами и агропромышленным сектором. Распространенность сенсibilизации колеблется в зависимости от

географических и климатических условий, генетической предрасположенности к атопии, длительности контакта с аллергеном, а также используемых методов диагностики в рутинной клинической практике.

Количественные данные, отражающие распространенность сенсibilизации к полной панели аллергенов Can f 1 – Can f 6, в Российской Федерации в настоящее время отсутствуют. Тем не менее, имеются отдельные исследования, предпринимающие попытку анализа данной проблемы. Так, в работе Gusareva и соавторов была проведена оценка распространенности сенсibilизации к основным ингаляционным аллергенам у 110 пациентов с атопической бронхиальной астмой в Тюменской области. Согласно полученным результатам, 57,3% обследованных имели сенсibilизацию к аллергенам кошек, в то время как сенсibilизация к аллергенам собак выявлена у 30% пациентов [24]. В исследовании Жукалиной Е.Ф. и соавторов впервые в РФ проведена компонентная диагностика чувствительности к Can f 1, Can f 2, Can f 3 и Can f 5. В выборке из 1113 пациентов аллергическая сенсibilизация к эпидермальным аллергенам была зарегистрирована у 468 (58,21%) человек. Из них сенсibilизация к аллергенам кошек составила 84,62% (396 пациентов), к аллергенам собак – 59,19% (277 пациентов), а к аллергенам лошадей – 20,94% (98 пациентов) [6].

1.3. Этиология, патогенез и клинические проявления аллергии на собак

Сенсibilизация к аллергенам собак сопряжена с влиянием биологически активных молекул, присутствующих в продуктах их жизнедеятельности – эпителиальных клетках, слюне, моче и шерсти. Клинически значимая форма аллергии проявляется развитием гиперергической реакции при контакте с аллергенами в дозах, которые в норме не вызывают реакций у здоровых людей.

К числу заболеваний, этиопатогенез которых связан с гиперчувствительностью к аллергенам собак, относят бронхиальную астму, аллергический ринит, аллергический конъюнктивит и атопический дерматит [37]. Указанные нозологии формируются вследствие дисрегуляции механизмов регуляции иммунной системы, приводящие к неадекватной активации адаптивного

иммунитета. Формирование аллергических заболеваний опосредовано комплексным взаимодействием наследственных факторов, эпигенетических модификаций, внешнесредовых воздействий и индивидуальных особенностей иммунной системы.

Патофизиологические механизмы аллергических реакций зависят от анатомической локализации и биологических характеристик эффекторных клеток. При аллергическом рините, индуцированном аллергенами собак, доминирует Th2-тип иммунного ответа, характеризующийся активацией CD4⁺ Т-хелперов второго типа, дифференцировкой В-лимфоцитов в IgE-продуцирующие плазматические клетки, а также вовлечением тучных клеток, эозинофилов, макрофагов и других эффекторов воспаления. Выработка интерлейкинов IL-3, IL-4, IL-5 и IL-13 усиливает эозинофильную инфильтрацию слизистой оболочки и способствует секреции аллерген-специфических антител класса IgE.

Иммуноглобулин E, связанный с FcεRI-рецепторами на поверхности тучных клеток, при повторном контакте с аллергенами инициирует дегрануляцию и выброс медиаторов воспаления – в частности, гистамина, лейкотриенов и простагландинов. Это приводит к вазодилатации, повышению проницаемости капилляров, стимуляции секреции слизи, зуде, чиханию и чрескожным или слизистым реакциям. Вслед за ранней фазой воспаления развивается поздняя, характеризующаяся клеточной инфильтрацией и персистирующим воспалением, что обуславливает длительное течение и хронизацию симптомов, включая назальную обструкцию [65].

Патогенетическая взаимосвязь между аллергическим ринитом и бронхиальной астмой выражается в сходных типах клеточной инфильтрации, включающей эозинофилы, Th2-лимфоциты и тучные клетки. Однако при бронхиальной астме патогенез усугубляется ремоделированием бронхиальных путей: развивается гиперплазия эпителиального слоя, метаплазия слизепродуцирующих клеток, гиперпродукция слизи, утолщение базальной мембраны, фиброз и гипертрофия гладкой мускулатуры бронхиальных стенок. Эти процессы способствуют формированию стойкой обструкции дыхательных путей,

лежащей в основе таких клинических проявлений, как экспираторная одышка, свистящее дыхание, кашель и чувство стеснения в груди.

Атопический дерматит при сенсибилизации к компонентам эпидермиса собак развивается на фоне выраженной дисфункции кожного барьера, нарушений микробиома кожи и избыточной активации Th2-ассоциированного иммунного ответа. Гистологически данная форма дерматита характеризуется наличием межклеточного отека (спонгиоза), инфильтрацией Т-лимфоцитами, эпидермальной гиперплазией, формированием микровезикул и повышенной колонизацией кожи патогенными штаммами *Staphylococcus aureus*. Комплекс указанных изменений способствует хронизации воспаления, усугублению клинической картины и снижению эффективности терапии [49].

1.4. Врожденный иммунитет в контексте аллергических заболеваний

Врожденный иммунитет играет ключевую роль в современных исследованиях иммунологии. Он представлен различными клеточными типами, включая эпителиальные и эндотелиальные клетки, гранулоциты (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, тучные клетки), дендритные клетки, моноциты, макрофаги, NK-клетки, инвариантные NKT-клетки, $\gamma\delta$ T-клетки и врожденные лимфоидные клетки (ILC) [60]. На эпителиальных, эндотелиальных, В-клетках и Т-клетках, дендритных клетках, моноцитах, макрофагах, нейтрофилах и фибробластах экспрессируются патоген-распознающие рецепторы (PRR), обеспечивающие распознавание патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) и молекулярных паттернов, ассоциированных с опасностью (DAMP). К основным классам PRR относятся Toll-подобные рецепторы (TLR), рецепторы с нуклеотид-связывающими доменами и обогащенными лейциновыми повторами (NLR), рецепторы гена I, индуцируемые ретиноевой кислотой (RLR), скэвенджер-рецепторы (SR) и лектиновые рецепторы С-типа (CLR) [87]. Активация PRR индуцирует воспалительные и адаптивные иммунные ответы посредством запуска сигнальных путей. В случае проникновения патогена

инициируется провоспалительный ответ, способствующий рекрутированию клеток адаптивного иммунитета и развитию адаптивного иммунного ответа.

Toll-подобные рецепторы (TLR) представляют собой трансмембранные белки, включающие внеклеточный домен с лейцин-обогащенными повторами (LRR), необходимый для распознавания PAMP, и цитоплазматический TIR-домен (Toll-IL-1 receptor), участвующий во взаимодействии с адаптерными белками и активации сигнальных путей. На сегодняшний день идентифицировано 13 типов TLR, из которых у человека обнаружено 10. Эти рецепторы подразделяются на поверхностные (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10) и внутриклеточные (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9).

В контексте аллергических заболеваний TLR играют значительную роль, поскольку они распознают антигены окружающей среды и могут способствовать развитию как проаллергического, так и противоаллергического ответа. Эпителиальные клетки являются первичной точкой инициации аллергического ответа, формируя плотные межклеточные контакты, выполняя барьерную функцию. В нормальных условиях дендритные клетки способны захватывать антигены, простираясь через плотные контакты эпителия. Однако при нарушении эпителиального барьера антигены проникают в подлежащие ткани, активируя врожденные и адаптивные иммунные механизмы.

Известно, что дипополисахариды (LPS) повышают проницаемость плотных контактов через TLR4, что усиливает захват аллергенов и способствует развитию астмы. Исследования на мышинной модели показали, что интраназальное введение овалбумина (OVA) само по себе не индуцирует воспаление дыхательных путей, но его комбинация с низкими или высокими дозами LPS приводит к Th2-опосредованной эозинофилии или Th1/Th17-опосредованной нейтрофилии. В настоящее время рассматривается возможность терапевтического манипулирования балансом Th1/Th2 или T-регуляторных клеток (Treg) с использованием агонистов TLR, что открывает перспективы профилактики и лечения астмы [87].

Данные исследований однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) свидетельствуют о связи

генетических вариантов генов семейства TLR с предрасположенностью к аллергическим заболеваниям. Нарушение экспрессии цитокинов макрофагами и дендритными клетками может приводить к дисбалансу между популяциями Th1/Th2/Th17, что коррелирует с развитием аллергопатологий [12]. Например, GWAS-исследования показали, что пациенты с атопическим дерматитом, несущие вариант R753Q TLR2, страдают от тяжелых форм экземы, ассоциированных со сниженной продукцией IL-8 по сравнению с диким типом [64].

Последние исследования подтверждают, что проживание в сельской местности или регионах с развитым фермерским хозяйством снижает риск детской аллергии, что связано с пренатальным воздействием микробных компонентов, включая эндотоксины. Этот феномен согласуется с гигиенической гипотезой аллергических заболеваний [61]. Пренатальный и постнатальный периоды являются критическими для формирования будущих аллергических заболеваний, поскольку в этот период происходит иммунное программирование плода [19,63]. Взаимодействие микробных компонентов с иммунной системой матери способствует формированию защитных механизмов у потомства. Treg-клетки играют важную роль в супрессии иммунного ответа и предотвращении патологической аутореактивности, а также в поддержании баланса между Th1/Th2/Th17-клетками в пренатальный и постнатальный периоды [70,91]. Установлено, что сигналинг через TLR2/TLR4, индуцируемый компонентами пептидогликана (PPG) или липида А (LPA), усиливает активность Treg и способствует их дифференцировке [43]. Таким образом, сигналинг TLR, индуцируемый микробными компонентами, является одним из ключевых факторов, способствующих формированию иммунной толерантности и снижению риска развития аллергических заболеваний.

1.5. Современные представления о системе адаптивного иммунитета

В ходе эволюции сформировались сложные механизмы защиты хозяина от чужеродных молекул. С одной стороны, врожденный иммунитет обеспечивает быструю идентификацию и элиминацию патогенов путем распознавания PAMP. С

другой стороны, адаптивный (приобретенный) иммунитет, обладая высокой специфичностью, направлен против конкретного антигена. Эффекторныe клетки адаптивного иммунитета образуются *de novo* в ответ на антиген. Одним из ключевых свойств приобретенного иммунитета является иммунологическая память, позволяющая при повторном контакте с патогеном обеспечивать более быстрый и эффективный ответ.

Основными клетками адаптивной иммунной системы являются лимфоциты, подразделяющиеся на Т- и В-лимфоциты. В-лимфоциты включают подтипы В1 (В1а, В1b), В2 (фолликулярные В-клетки, В-клетки маргинальной зоны) и В-регуляторные клетки [59]. Т-клетки классифицируются по структуре TCR на $\alpha\beta$ Т-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки. Среди $\alpha\beta$ Т-клеток выделяют CD4⁺ (Th0, Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg, фолликулярные Т-клетки) и CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты) [40].

Развитие лимфоцитов происходит в первичных лимфоидных органах – костном мозге и тимусе. Гемопоэтические стволовые клетки (HSC) являются источником всех кроветворных клеток и подразделяются на долгоживущие (LTSC) и короткоживущие (STSC) популяции [88]. На ранних стадиях эмбриогенеза HSC развиваются в печени плода, а позднее их дифференцировка продолжается в костном мозге. STSC дифференцируются в общие миелоидные (CMP) и лимфоидные предшественники (CLP). CLP мигрируют в тимус, где дифференцируются в ранние тимические предшественники (ETP). Их созревание происходит в корковом веществе тимуса, начиная с дважды негативных клеток DN (CD4-CD8-), затем переходя в дважды позитивные DP (CD4+CD8+), а в конечном итоге – в зрелые CD4⁺ и CD8⁺ клетки [78].

Развитие и коммитирование В-клеток из CLP осуществляется в костном мозге. В-клетки экспрессируют В-клеточный рецептор (BCR), а их развитие начинается с VDJH-реаранжировки тяжелых цепей, приводящей к образованию больших пре-В-клеток. Успешная VDJH-реаранжировка приводит к экспрессии полной тяжелой цепи иммуноглобулина (Ig) и формированию пре-BCR. Сигналинг от пре-BCR запускает пролиферацию и дифференцировку в малые про-В-клетки, после чего происходит VJ-реаранжировка легкой цепи Ig и формирование

полноценного BCR. Незрелые В-клетки покидают костный мозг, завершая дифференцировку в селезенке, где они становятся фолликулярными В-клетками или В-клетками маргинальной зоны [54,71].

Адаптивный иммунный ответ инициируется поглощением антигена антигенпрезентирующими клетками (APC), в частности, незрелыми дендритными клетками. После фагоцитоза антиген подвергается процессингу в эндосомах, где расщепляется на пептиды и презентуется в комплексе главного комплекса гистосовместимости (МНС) [56]. Созревание DC сопровождается повышенной экспрессией костимулирующих молекул, необходимых для взаимодействия с наивными Т-клетками [55].

Активированные DC мигрируют во вторичные лимфоидные органы, где происходит прайминг наивных Т-клеток. Их активация требует взаимодействия TCR с пептидом в комплексе с МНС, сигналинга от костимуляторных молекул и цитокинов, регулирующих клональную экспансию. В зависимости от цитокинового микроокружения Т-клетки дифференцируются в эффекторные субпопуляции Th1, Th2 и Treg [62]. Th1-клетки регулируют клеточный иммунитет, включая реакции гиперчувствительности и активацию цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Th2-клетки участвуют в активации В-лимфоцитов, секреции IgE и активации эозинофилов, способствуя развитию аллергических реакций и воспаления. CD8⁺ Т-клетки дифференцируются в ЦТЛ, уничтожающие инфицированные клетки [44].

Т-фолликулярные хелперные клетки (TFH), являясь субпопуляцией CD4⁺ Т-клеток, функционируют во вторичных лимфоидных органах и необходимы для развития герминативных центров (GC). Для их дифференцировки требуется экспрессия факторов BCL6, CD28 и CXCR5. TFH-клетки взаимодействуют с фолликулярными В-клетками, презентующими антиген в комплексе с МНС II класса [77]. Взаимодействие BCR с антигеном, последующая интернализация и процессинг антигена позволяют В-клеткам презентовать его CD4⁺ Т-клеткам, инициируя В-клеточную активацию, пролиферацию и дифференцировку через сигнальные пути CD40-CD40L, CD28-CD80/86, ICOS-ICOSL, PD1-PD1L [28].

Герминативный центр вторичных лимфоидных органов играет критическую роль в диверсификации BCR. В ходе соматической гипермутации (SHM) образуются высокоаффинные антитела, а классовая рекомбинация (CSR) позволяет генерировать антитела с различными эффекторными функциями. Активированные В-клетки мигрируют в В-клеточный фолликул, где подвергаются SHM, после чего видоизмененные BCR взаимодействуют с антигенами фолликулярных дендритных клеток (FDC) и проходят позитивную селекцию. В дальнейшем они дифференцируются в высокоаффинные клетки, продуцирующие антитела.

1.6. Патоиммунологические основы реакций гиперчувствительности

Как упоминалось ранее, в соответствии с классификацией Гелла и Кумбса существует четыре типа реакций гиперчувствительности. Однако в настоящее время данная классификация была расширена, включив подразделение гиперчувствительности II типа на два подтипа (таблица 1).

Подтип IIa характеризуется цитотоксическими реакциями, опосредуемыми антителами. Подтип IIb связан с реакциями клеточной стимуляции, также опосредуемыми антителами, и включает такие заболевания, как болезнь Грейвса и аутоиммунный тип хронической идиопатической крапивницы.

Дополненная классификация также расширила IV тип гиперчувствительности, подразделив его на четыре подтипа: IVa, IVb, IVc и IVd.

Подтип IVa связан с CD4⁺ Th1-клеточно-опосредованными реакциями, приводящими к активации макрофагов (например, образование гранул при туберкулезе, развитие сахарного диабета 1 типа).

Подтип IVb ассоциирован с CD4⁺ Th2-клеточно-опосредованными реакциями, вызывающими эозинофильное воспаление (персистирующая астма, аллергический ринит).

Подтип IVc характеризуется CD8⁺ цитотоксическими Т-клеточно-опосредованными реакциями, инициирующими перфорин-гранзим В-ассоциированный апоптоз (синдром Стивенса-Джонсона, токсический эпидермальный некролиз).

Подтип IVd связан с Т-клеточно-опосредованными реакциями, приводящими к нейтрофильному воспалению (пустулезный псориаз, острый генерализованный экзантематозный пустулез).

Следует отметить, что некоторые заболевания могут включать элементы нескольких типов гиперчувствительности, что усложняет их классификацию и патогенетическое понимание [14].

Таблица 1 – Обобщенная классификация реакций гиперчувствительности

Классификация	Иммунореактанты	Клинические признаки
1	2	3
I тип	Тучные клетки, IgE антитела	Анафилаксия, крапивница, ангиодема, астма, аллергический ринит
IIa тип	Комплемент, IgM и IgG антитела	Иммунные цитопении
IIb тип	Реакции антитело-опосредованного клеточного стимулирования	Базедова болезнь, хроническая идиопатическая крапивница
III тип	Имунокомплексные реакции с привлечением комплемента	Сывороточная болезнь, васкулиты
IVa тип	Th1 клеточно-опосредованные реакции с активацией макрофагов	Диабет I типа, контактный дерматит
IVb тип	Th2 клеточно-опосредованные реакции эозинофильного воспаления	Персистирующая астма, аллергический ринит
IVc тип	Цитотоксические Т-клеточно-опосредованные реакции (с привлечением перфоринов/гранзимов)	Синдром Стивенса-Джонсона, токсикодермальный некролиз
IVd тип	Т-клеточно-опосредованные реакции нейтрофильного воспаления	Острый генерализованный экзантематозный пустулез, болезнь Бехчета

1.6.1. Реакция гиперчувствительности немедленного / анафилактического типа

В течение жизни каждый человек постоянно находится в контакте с различными аллергенами, однако только у части популяции наблюдаются аллергические заболевания. Несмотря на то, что большинство индивидов не

демонстрирует явных признаков аллергии, эпидемиологические данные свидетельствуют о наличии иммунной гиперреактивности на один или несколько аллергенов примерно у 50% населения.

Аллергическая реакция немедленного типа (гиперчувствительность I типа) обусловлена активацией гуморального иммунного звена с преимущественной продукцией иммуноглобулинов класса E (IgE), активацией базофилов и тучных клеток с последующей их дегрануляцией. Клинически данный тип гиперчувствительности может манифестировать в форме анафилактических реакций, аллергического ринита, конъюнктивита, бронхиальной астмы и уртикарных высыпаний. Продукция аллерген-специфических IgE чаще всего опосредована наследственными факторами. Согласно результатам близнецовых исследований, степень генетической предрасположенности к аллергическим заболеваниям и атопии варьирует в пределах 33–76%. Идентифицировано множество генетических локусов, ассоциированных с развитием бронхиальной астмы, включая гены, кодирующие цитокины и хемокины, молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС), белки межклеточной сигнализации, транскрипционные регуляторы и структурные компоненты клеток дыхательных путей.

Иммунопатогенез аллергии включает две ключевые стадии: первичную сенсибилизацию и вторичную реакцию гиперчувствительности при повторной экспозиции к аллергену. Первичное проникновение аллергена в организм сопровождается его распознаванием и захватом антигенпрезентирующими клетками (АПК), включая дендритные клетки, макрофаги и В-лимфоциты. После внутриклеточного процессинга антиген экспонируется на поверхности АПК в комплексе с молекулами МНС II класса, инициируя активацию наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов и их дальнейшую дифференцировку в Th2-клетки. Последующее взаимодействие Th2-клеток с В-лимфоцитами, при участии костимулирующих сигналов, приводит к их созреванию в IgE-продуцирующие плазматические клетки.

Иммуноглобулины класса E характеризуются высокой аффинностью к FcεRI – высокоаффинным рецепторам, экспрессируемым на поверхности тучных клеток и базофилов. Взаимодействие IgE с FcεRI значительно увеличивает период его

полужизни: с 1–2 суток в свободной циркуляции до нескольких недель при клеточной фиксации. Основной пул IgE в организме связан с тучными клетками, преимущественно локализованными в слизистых оболочках и соединительной ткани. При повторном контакте с аллергеном происходит его связывание с несколькими молекулами IgE, что вызывает кластеризацию FcεRI и инициирует дегрануляцию эффекторных клеток [93].

Рецептор FcεRI представляет собой тетрамерный белковый комплекс, включающий α-субъединицу (отвечающую за связывание IgE), β-субъединицу с четырьмя трансмембранными доменами и две γ-субъединицы, соединенные дисульфидными мостиками. Внутриклеточные участки β- и γ-субъединиц содержат ITAM-мотивы, которые фосфорилируются тирозинкиназой Lyn (семейства Src), активируя сигнальный каскад. Эти фосфорилированные ITAM служат сайтами связывания для киназы Syk, дальнейшая активация которой приводит к запуску множественных сигнальных путей, включая Ras/MAPK, PI3K и тирозинкиназы Брутона (Btk). Конечным этапом активации FcεRI является транскрипционная активация генов под контролем факторов NFAT, NF-κB и AP-1, регулирующих синтез провоспалительных медиаторов, включая цитокины, эйкозаноиды и другие биологически активные молекулы [38,41].

Увеличение внутриклеточной концентрации Ca²⁺ и активация протеинкиназы C (PKC) стимулируют процесс дегрануляции – экзоцитоз гранул, содержащих медиаторы воспаления. В этом процессе ключевую роль играют белки семейства SNARE, обеспечивающие слияние мембранных структур. Гранулы тучных клеток и базофилов содержат широкий спектр биологически активных веществ: протеолитические ферменты (катепсины, триптазы, химазы, карбоксипептидазы), а также медиаторы воспаления – гистамин, серотонин, гепарин, хондроитинсульфат, хемокины, нейропептиды (вещество P, VIP), и синтезируемые *de novo* цитокины и липидные медиаторы [34].

Высвобождение указанных медиаторов вызывает характерные клинические проявления аллергических реакций. Гистамин, как один из центральных эффекторов, индуцирует расширение сосудов, повышение их проницаемости, спазм гладкой мускулатуры бронхов и гиперсекрецию слизистых желез. Реакции

немедленного типа, связанные с IgE-опосредованным механизмом, лежат в основе таких патологий, как аллергический ринит, бронхиальная астма, экзема и аллергический конъюнктивит. В клинической практике аллергический ринит может иметь как сезонный (при пылении растений), так и круглогодичный характер (вследствие сенсибилизации к аллергенам бытового происхождения – перхоти животных, плесени, клещам домашней пыли). Аллергическая бронхиальная астма характеризуется воспалением и гиперреактивностью дыхательных путей, проявляясь эпизодами кашля, хрипов, экспираторной одышки и ощущения сдавления в грудной клетке. Атопический дерматит (экзема) протекает с выраженным зудом, эритемой, сухостью и лихенификацией кожи, нередко сочетается с другими формами атопии, такими как пищевая аллергия, ринит и астма [98].

Наиболее тяжелым клиническим проявлением гиперчувствительности I типа является системная анафилаксия – острая, потенциально фатальная реакция, сопровождающаяся резким падением артериального давления, обструкцией дыхательных путей, потерей сознания и возможным летальным исходом. Наиболее частыми триггерами анафилаксии являются пищевые аллергены, яды насекомых и лекарственные препараты [21].

1.6.2. Реакция гиперчувствительности II типа/антителоопосредованная

Считается, что гиперчувствительность II типа связана с повреждением тканей в результате клеточного лизиса, вызванного прямым связыванием антител, преимущественно изотипов IgM и IgG, с поверхностными антигенами. Основным иммунным эффекторным механизмом данного типа гиперчувствительности является иммунный цитолиз.

Иммунный цитолиз реализуется тремя основными путями: комплемент-зависимый цитолиз – активация системы комплемента после связывания патологических антител с антигенами на поверхности клеток-мишеней, что приводит к их разрушению; FcR-зависимый цитолиз, осуществляемый фагоцитами (макрофагами, нейтрофилами) и NK-клетками; антителозависимая клеточная

цитотоксичность (ADCC) – взаимодействие антител с Fc-рецепторами на эффекторных клетках, что приводит к лизису мишеней.

Механизмы гиперчувствительности II типа участвуют в развитии аллоиммунных гемолитических заболеваний, гемолитических процессов, вызванных лекарственной гиперчувствительностью, а также аутоиммунных состояний, при которых иммунная система атакует собственные клетки организма [42].

1.6.3. Реакция гиперчувствительности III типа/иммунокомплексная патология

Гиперчувствительность III типа (иммунокомплексный тип) характеризуется патологическим иммунным ответом, опосредованным образованием циркулирующих иммунных комплексов, состоящих из антигенов и антител. Эти комплексы формируются в кровотоке и впоследствии откладываются в различных тканях-мишенях, включая дерму, синовиальные оболочки суставов, сосудистую стенку и почечные клубочки, что инициирует развитие локализованных или системных воспалительных реакций.

Ключевым звеном патогенеза данного типа гиперчувствительности является активация системы комплемента по классическому пути. Комплемент-опосредованная хемотаксис и активация воспалительных клеток – преимущественно моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов – приводят к высвобождению широкого спектра медиаторов воспаления. Среди них – лизосомальные ферменты, активные формы кислорода (АФК), а также провоспалительные цитокины, способствующие повреждению тканей и поддержанию воспалительного фона.

Имунокомплексные механизмы лежат в основе патогенеза ряда аутоиммунных и иммунопатологических заболеваний. К наиболее типичным патологиям, ассоциированным с гиперчувствительностью III типа, относят сывороточную болезнь, экзогенный аллергический альвеолит, системную красную волчанку (СКВ), постстрептококковый гломерулонефрит и ревматоидный артрит.

Эти заболевания характеризуются хроническим воспалением, вызванным персистенцией иммунных комплексов и их повторным отложением в тканях.

Принципиальным отличием гиперчувствительности III типа от реакций II типа является локализация образования иммунных комплексов: при III типе они формируются в циркуляции и только затем оседают в тканях, тогда как при II типе взаимодействие антител с антигенами происходит непосредственно на поверхности клеток или в базальных мембранах [57].

1.6.4. Реакция гиперчувствительности IV типа/замедленный тип реакций

Согласно классификации Гелла и Кумбса гиперчувствительность IV типа относится к реакциям замедленного типа (ГЗТ), манифестирующим спустя 12–72 часа после контакта с аллергеном. В отличие от I–III типов, обусловленных преимущественно гуморальными механизмами и продукцией антител, ГЗТ представляет собой клеточно-опосредованную иммунную реакцию, инициируемую Т-лимфоцитами в тесном взаимодействии с АПК.

Патогенез ГЗТ связан с действием различных популяций Т-клеток, прежде всего CD4⁺ Th1-лимфоцитов, а также макрофагов и дендритных клеток. При распознавании экзогенного или аутоантигенного эпитопа в комплексе с МНС II класса, Th1-клетки активируются и продуцируют провоспалительные цитокины, включая интерферон- γ (IFN- γ), который играет ключевую роль в модуляции клеточного иммунного ответа. Эффекторныe клетки индуцируют локальный воспалительный процесс, направленный на элиминацию антигенного стимула.

Одним из характерных морфологических проявлений гиперчувствительности замедленного типа является формирование гранулем. В ответ на персистирующий антигенный стимул резидентные клетки врождённого иммунитета – тучные клетки, тканевые макрофаги (гистиоциты) и $\gamma\delta$ Т-лимфоциты – синтезируют TNF- α и IFN- γ , что способствует хемотаксису и активации моноцитов и нейтрофилов. Дендритные клетки, захватившие антиген, мигрируют в регионарные лимфатические узлы, где секретируют интерлейкин-12 (IL-12), стимулирующий дифференцировку наивных CD4⁺ Т-клеток в Th1-фенотип.

Последняя популяция, в свою очередь, усиливает клональную экспансию под действием IL-2.

Активированные Th1-клетки рекрутируются в очаги воспаления, преимущественно в зоны с нарушенной микроциркуляцией, обусловленной действием TNF и хемотаксических факторов. Их повторная активация в тканях инициирует продукцию дополнительного пула цитокинов, поддерживающих хроническое воспаление при персистенции антигенного раздражителя.

К числу патологий, патогенез которых связан с реакциями гиперчувствительности замедленного типа, относятся инфекции с внутриклеточной персистенцией возбудителя (проказа, туберкулез), паразитарные инвазии (шистосомоз), а также хронические воспалительные и аутоиммунные заболевания, такие как саркоидоз и болезнь Крона [97].

1.7. Компонентная диагностика в молекулярной аллергологии

В настоящее время в Российской Федерации диагноз аллергии на собаку может быть установлен на основании клинического анамнеза и кожных аллергологических тестов. Кожные аллергологические тесты, также известные как прик-тесты (SPT), представляют собой доступный и быстрый диагностический метод, позволяющий подтвердить сенсibilизацию к определенной группе аллергенов.

Чувствительность и специфичность SPT варьируются в пределах 68 – 100% и 70 – 91% соответственно. Однако точность теста может зависеть от подготовки алергоэкстрактов, что может приводить к ложноположительным или ложноотрицательным результатам.

Аллергенные экстракты представляют собой гетерогенную смесь аллергенных и неаллергенных компонентов, включающих белки, гликопротеины, полисахариды, липиды, нуклеиновые кислоты, низкомолекулярные метаболиты, соли и пигменты. Они получают из природного сырья, например шерсти или высушенных частей растений, с использованием физических и химических методов экстракции. Конечный продукт представляет собой смесь аллергенных

компонентов и побочных соединений, что обуславливает вариабельность их состава и диагностического потенциала (рисунок 2).

Контроль качества аллергенных экстрактов является важным этапом производства, обеспечивающим надежность диагностического теста. Однако стандартизация их количественного и качественного состава представляет значительные сложности. Кроме того, аллергенные экстракты обладают высокой кросс-реактивностью с белками различных источников, что может затруднять точное определение причинного аллергена [84].

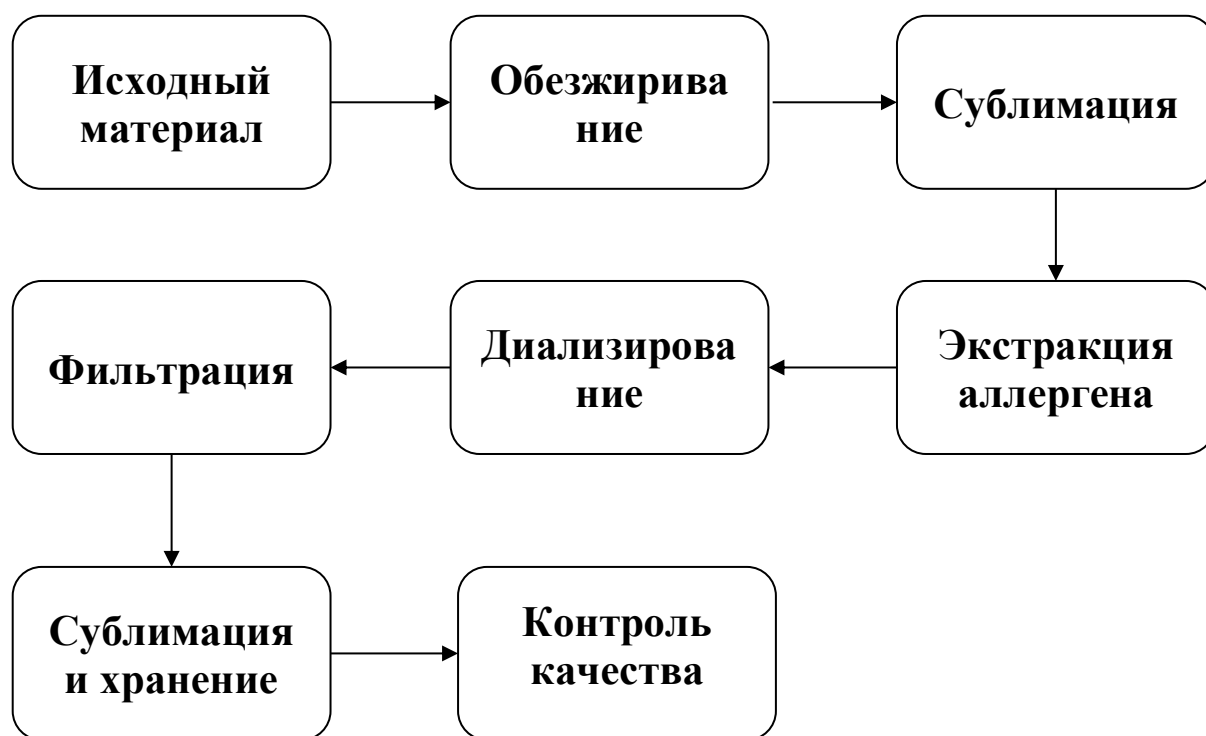


Рисунок 2 – Пример производственного процесса аллергенных экстрактов

Переход от использования экстрактов к молекулярным индивидуальным алергокомпонентам, известный как компонентная алергологическая диагностика (CRD), значительно повышает точность диагностики аллергии и позволяет врачам назначать более эффективное лечение. Этот диагностический подход основан на применении очищенных нативных или рекомбинантных алергенов для количественного определения специфических IgE-антител к конкретным алергенам, что позволяет с высокой точностью выявить сенсibilизацию пациента и определить источник аллергии.

Для диагностики sIgE в данном методе используются высокоочищенные природные или рекомбинантные аллергены, полученные методами генной инженерии (рисунок 3). Среди наиболее распространенных диагностических методов в настоящее время: ImmunoCAP™ (Phadia/Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Швеция), ISAC (Thermo Fisher Scientific, Уппсала, Швеция), Immulite (Siemens Healthcare Diagnostics, Лос-Анджелес, Калифорния), ALEX (Allergy Explorer) (MacroArray Diagnostics, Вена, Австрия). Данные диагностические платформы, одобренные FDA, представляют собой методы иммуноферментного анализа, обеспечивающие количественные или полуколичественные результаты уровней специфического IgE в килоюнитах на литр (kU/L) или стандартизированных единицах ISAC (ISU-E). В большинстве данных методов используются рекомбинантные аллергенные компоненты.

Процесс получения рекомбинантных аллергенов включает следующие ключевые этапы. Выбор гена аллергена – синтез химическим путем или выделение из природного источника. Клонирование гена – вставка нуклеотидной последовательности аллергена в вектор. Трансформация в бактериальный штамм – получение штамма-продуцента. Инокуляция в питательную среду – рост бактерий с последующей индукцией синтеза белка. Изоляция и очистка белков – использование методов хроматографии для получения высокоочищенного аллергена.

Благодаря компонентной диагностике становится возможным различать клинически значимую сенсibilизацию от малозначимой, что позволяет оценивать прогноз заболевания и разрабатывать персонализированные стратегии лечения. Кроме того, этот метод позволяет выявлять кросс-реактивность между различными семействами белков. Например, известны случаи перекрестной реактивности между аллергенами Can f 1 и Fel d 1, Fel d 7 или Can f 3 и Equ c 3 (таблица 2).

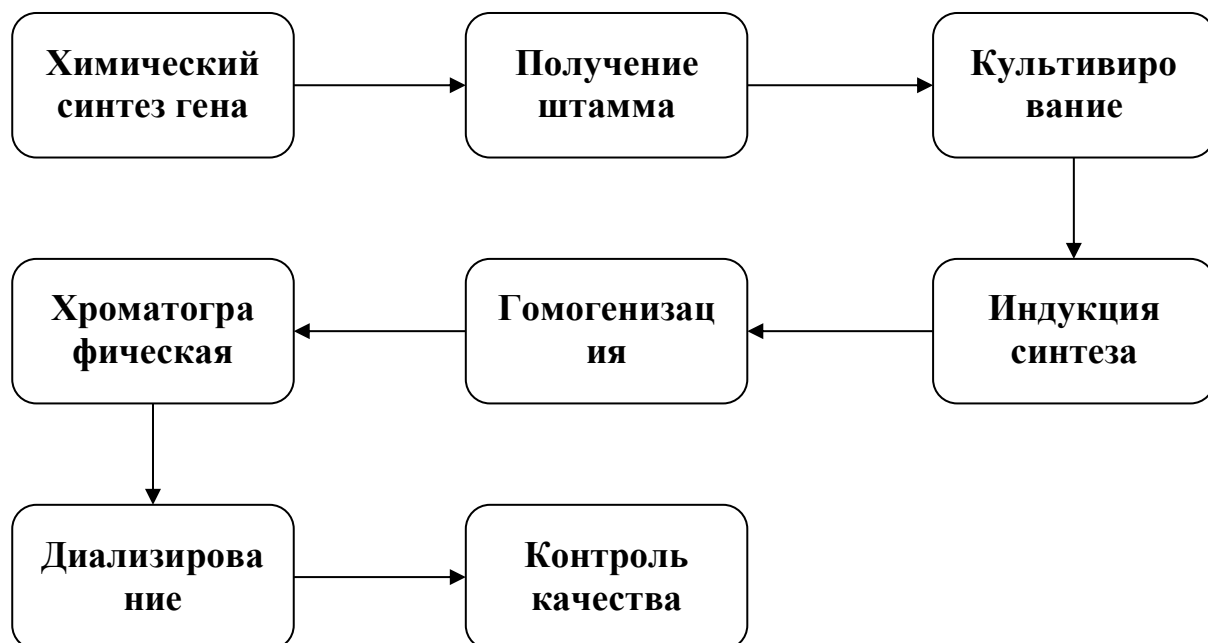


Рисунок 3 – Пример производственного процесса рекомбинантных молекулярных аллергенов

Таблица 2 – Сравнительная характеристика аллергенных экстрактов и рекомбинантных аллергенов

Экстракты	
Преимущества	Недостатки
1	2
Быстрая пробоподготовка, которая не требует сложных хроматографических манипуляций	Гетерогенный состав неизвестного состава
Широкая доступность для рутинной клинической практики	Контаминация сторонними аллергенами
Быстрая возможность идентифицировать источник аллергической сенсibilизации	Различный качественный и количественный состав, концентрация аллергенов непостоянна
-	Нестабильны и могут быстро деградировать
-	Возможность местных и системных реакций в ответ на аллергенный экстракт
-	Не применимы для CRD
-	Могут не соответствовать современным регуляторным нормативным актам для медицинских продуктов

Продолжение таблицы 2

1	2
Рекомбинантные аллергены	
Преимущества	Недостатки
Высокоочищенные компоненты известного состава	Требуют разработки технологического процесса и квалифицированного персонала
Могут производиться в соответствии с GMP	Требуется высоко оснащенная лаборатория или производственная линия для подготовки аллергенов
Количественный и качественный состав постоянный, производственный процесс воспроизводимый	Требуется многоступенчатый хроматографический процесс для удаления контаминантных примесей
Соответствуют современным регуляторным нормативным актам для медицинских продуктов	Необходимость производить каждый аллергокомпонент отдельно
Позволяют производить диагностику в рамках CRD	-
Предоставят детальный профиль аллергической сенсibilизации пациента	-
Производство независимо от естественных источников аллергенов	-

1.8. Характеристика молекулярных аллергокомпонентов собак

В текущей классификации Международного союза иммунологических обществ (IUIS) зарегистрировано восемь аллергенных компонентов семейства *Canis familiaris* (Can f 1 – Can f 8), классифицированных на основании их биохимической структуры и различий в аллергенной активности (таблица 3) [99]. Эти аллергены широко представлены в перхоти, слюне, моче и сыворотке крови собак. Аллергены собак принадлежат к различным белковым семействам, включая: липокалины, сывороточные альбумины, трипсин-подобные сериновые протеазы, цистатины.

Белки составляют основную часть аллергенов собак, однако они по-разному способны связывать аллерген-специфические антитела. На сегодняшний день выделяют: мажорные аллергены – связывают более 50% специфических IgE в сыворотке пациентов с аллергией и минорные аллергены – связывают менее 50% специфических IgE в сыворотке пациентов.

Определение мажорных и минорных аллергенов имеет важное значение для диагностики и разработки таргетных терапевтических стратегий [33].

Таблица 3 – Современная классификация алергокомпонетов собак

Аллерген	Семейство	Источник происхождения	Молекулярная масса (кДа)	Гликозилирование
1	2	3	4	5
Can f 1	Липокалины	Перхоть, эпителий, слюна	23-25	Присутствует
Can f 2	Липокалины	Перхоть, слюна	19	Присутствует
Can f 3	Альбумины	Перхоть, слюна, сыворотка	66	Отсутствует
Can f 4	Липокалины	Перхоть, слюна	18	Отсутствует
Can f 5	Калликреины	Перхоть, моча	28	Присутствует
Can f 6	Липокалин	Перхоть, слюна	23	Присутствует
Can f 7	Эпидидимальный секреторный белок E1 (Семейство белков C2 Ниманна-Пика)	Эпителий, перхоть	16	Присутствует
Can f 8	Цистатины	Эпителий	38	Присутствует

1.8.1. Семейство липокалинов

Большая часть аллергенов, продуцируемая видом *Canis Familiaris*, относится к семейству липокалинов, в том числе Can f 1, Can f 2, Can f 4 и Can f 6. Эти молекулы, как правило, состоят из 100–200 аминокислот и классифицируются как внеклеточные белки-транспортёры. Несмотря на сравнительно низкий уровень аминокислотной идентичности (в пределах 18–25%), липокалины обладают сходной пространственной структурой, которая представлена антипараллельной β -бочкой, состоящей из восьми β -цепей и служащей для связывания гидрофобных молекул. Как правило, эти белки содержат одну или несколько дисульфидных связей, стабилизирующих третичную структуру. После трансляции липокалины могут подвергаться O- или N-гликозилированию. У собак аллергены данной группы преимущественно экспрессируются в слюне, эпителии и шерстном покрове. Благодаря своей аэрозольной форме, данные аллергены легко распространяются по воздуху, обнаруживаются чаще всего в жилых и общественных помещениях и часто вызывают сенсibilизацию с клинически значимыми симптомами, вовлекая дыхательные пути.

Can f 1 является основным ингаляционным аллергеном собак, представленным белком массой 23–25 кДа, обнаруживаемым преимущественно в эпидермисе, слюне и шерсти. Он активно присутствует в воздухе в составе частиц более 10 мкм, однако около 20% его фракций обладают аэродинамическим диаметром менее 5 мкм [48]. По данным исследования А. Konieczny и соавт., у 70% пациентов с аллергией на собак выявляются специфические IgE к Can f 1 при использовании экстрактов собачьих аллергенов [96]. В других работах сообщается о сенсibilизации к Can f 1 у 92% таких пациентов [13]. Содержание Can f 1 в шерсти может существенно варьировать – до 10-кратных различий даже среди собак одной породы [35]. Примечательно, что у «гипоаллергенных» пород собак уровень Can f 1 может быть даже выше, чем у обычных собак [22].

Минорный аллерген Can f 2 (19 кДа) экспрессируется преимущественно в слюне и синтезируется околоушными и подъязычными слюнными железами. Его

структура, как и у большинства липокалинов, представляет собой антипараллельную β -бочку. По данным Saarelainen S. и соавт., сенсibilизация к Can f 2 отмечается у 28% пациентов с подтверждённой аллергией на собак [20]. При этом чувствительность к Can f 2 нередко сопровождается тяжёлыми формами бронхиальной астмы и выраженным воспалением в дыхательных путях [76].

Can f 4 представляет собой мажорный липокалиновый аллерген массой около 18 кДа, локализующийся преимущественно в эпителии и шерсти. Размеры частиц Can f 4, содержащихся в воздушных аэрозолях, варьируют от 0,14 до 8,1 мкм [48]. Этот аллерген тесно связан с бронхиальной астмой и рассматривается как индикатор клинически значимой сенсibilизации к аллергенам собак. Can f 4 обладает вариабельной способностью связывать IgE, что обусловлено его склонностью к денатурации. В одном из исследований, проведённом Saarelainen S. и соавт., сенсibilизация к Can f 4 выявлена у 60% обследованных пациентов [20]. В другом клиническом исследовании положительные результаты на Can f 4 диагностированные методом иммуноферментного анализа (далее – ИФА) наблюдались у 83% пациентов, однако положительные результаты, полученные методом иммуноблотинга показали реакцию только у 46%, что указывает на зависимость IgE-связывающей активности от конформационного состояния белка [46].

Can f 6 – мажорный аллерген липокалиновой природы с массой 27–29 кДа, обнаруживаемый в слюне и шерсти, преимущественно секретиремый подчелюстными железами. Размер его аэрозольных частиц колеблется от 0,14 до 8,1 мкм [48]. Can f 6 имеет высокую гомологию с аллергенами других видов: 67% сходства с кошачьим Fel d 4 и 55% – с лошадиным Equ c 1 [29]. Этот аллерген часто ассоциируется с респираторной симптоматикой, включая астму и ринит, и считается важным диагностическим маркером аллергии на собак [79]. В одном из клинических наблюдений сенсibilизация к Can f 6 выявлена у 47% больных [25], а по данным Hilger C. и соавт., из 44 пациентов, сенсibilизированных как к аллергенам кошек, так и собак, у 61% выявлена реактивность к Can f 6 [45]. В исследовании детской популяции в Китае сенсibilизация к этому аллергену выявлена у 56% детей, что подтверждает его диагностическую значимость [23].

1.8.2. Семейство сывороточных альбуминов

Can f 3 классифицируется как представитель группы сывороточных альбуминов и обладает молекулярной массой около 69 кДа. Альбумины представляют собой глобулярные белки, выполняющие транспортную функцию, к которым, помимо сывороточного альбумина, относятся α -фетопротеин, связывающий витамин D белок, афамин, а также внеклеточный матриксный белок 1. Эти молекулы циркулируют в системном кровотоке, обладая способностью обратимо связывать широкий спектр эндогенных и экзогенных лигандов, включая лекарственные средства, жирные кислоты, гормоны и другие низкомолекулярные соединения.

С точки зрения аллергенного потенциала, сывороточные альбумины традиционно рассматриваются как минорные компоненты аллергенного спектра. У собак Can f 3 преимущественно детектируется в составе сыворотки крови, слюны и эпителиальных чешуек. Структурно альбумины высоко консервативны как по аминокислотной последовательности, так и по пространственной организации. Их третичная структура формируется за счёт α -спиральных участков, стабилизированных дисульфидными связями, что обеспечивает необходимую устойчивость к физико-химическим воздействиям.

Особенностью Can f 3 является его выраженная гомология с альбуминоподобными белками других видов млекопитающих, что создаёт предпосылки для формирования перекрёстной сенсibilизации. Установлено, что степень аминокислотной идентичности между Can f 3, Fel d 2 (кошачий альбумин) и человеческим сывороточным альбумином (HSA) достигает примерно 80% [15]. Тем не менее, молекулярные механизмы IgE-опосредованного ответа на альбумины остаются недостаточно раскрытыми и требуют дальнейшего изучения.

Согласно результатам клинических исследований, у приблизительно 35% пациентов с диагностированной аллергией на собак выявляются специфические IgE-антитела к Can f 3 [66]. Наличие сенсibilизации к данному компоненту достоверно ассоциировано с повышенным риском развития респираторных

аллергопатологий, включая бронхиальную астму и аллергический ринит, а также полисенсibilизацией. Эти данные указывают на значимость Can f 3 как потенциального маркера тяжёлых форм аллергических заболеваний и подчеркивают необходимость его включения в состав аллергодиагностических панелей.

1.8.3. Семейство калликреинов

Can f 5 представляет собой аргининэстеразу с молекулярной массой 28 кДа. Этот белок относится к андроген-регулируемым простатическим калликреинам, продуцируется главным образом в простате и секретируется в мочу. Кроме того, Can f 5 может быть обнаружен в перхоти и шерсти собак [32].

Основными продуцентами Can f 5 являются кобели. Более 70% пациентов с аллергией на собак имеют специфические IgE-антитела к Can f 5 [7]. Примерно у 1/3 пациентов с аллергией на собак выявляется моносенсibilизация к Can f 5, что подтверждает его статус мажорного аллергена [86]. Перекрестная реактивность: Can f 5 демонстрирует 60% идентичность аминокислотной последовательности с простатспецифическим антигеном человека (PSA) и может перекрестно реагировать с ним (таблица 4).

В нескольких исследованиях была установлена связь между сенсibilизацией к Can f 5 и аллергией на семенную жидкость человека, богатую PSA [74]. В крупном популяционном исследовании BAMSE/MeDALL было показано, что Can f 5 является наиболее распознаваемым собачьим аллергеном во всех возрастных группах детей с аллергией на кошек и собак [80]. В других исследованиях сообщается о более низких показателях сенсibilизации (31–52%), однако среди этих пациентов чаще встречается моносенсibilизация к Can f 5 [10,17,82].

Таблица 4 – Перекрестная реактивность алергокомпонентов собак Can f 1 – Can f 6 с алергокомпонентами других семейств

Аллерген	Кросс-реактивность
1	2
Can f 1	Fel d 1, Fel d 7
Can f 2	Fel d 4
Can f 3	Fel d 2, Sus s 1, Bos d 6, Equ c 3, Ory c 1
Can f 4	Одоронто-связывающий белок коров
Can f 5	PSA человека
Can f 6	Fel d 4, Equ c 1

1.8.4. Минорные аллергены собак

Can f 7 и Can f 8 классифицируются как минорные аллергены собак. Can f 7 принадлежит к семейству С2 белков Ниманна-Пика и имеет молекулярную массу 16 кДа. Этот белок, также известный как секреторный белок придатка яичка Е1 или NPC2 (внутриклеточный транспортер холестерина Ниманна-Пика 2), является одним из двух основных лизосомальных транспортных белков, участвующих в процессах транспорта холестерина из ЛПНП.

Белки семейства С2 Ниманна-Пика высококонсервативны и обладают схожей последовательностью среди всех млекопитающих, поскольку выполняют аналогичные функции. Их вторичная структура представлена β -сэндвичем, аналогичным доменам иммуноглобулинов. Около 14 – 17% пациентов с аллергией на собак сенсibilизированы к Can f 7.

Can f 8 относится к семейству цистатинов и имеет молекулярную массу 38 кДа. Цистатины представляют собой естественные ингибиторы цистеиновых протеаз. Can f 8 преимущественно экспрессируется в перхоти собак.

Как Can f 8, так и Fel d 3 являются минорными аллергенами с распространенностью сенсibilизации около 13% и 10% соответственно. Известно, что Can f 8, Fel d 3 и цистатин человека способны перекрестно реагировать между собой, что может приводить к клинически значимой перекрестной аллергии.

1.9. Метод ImmunoCAP для диагностики аллергии на собак

Молекулярная диагностика аллергии *in vitro* заключается в оценке профиля сенсibilизации пациентов на молекулярном уровне с использованием аллергенных компонентов, которые могут быть либо высокоочищенными натуральными белками, либо рекомбинантными аллергенами [27]. В настоящее время применяются различные методы иммуноанализа для детекции специфических IgE к аллергенным компонентам, включая одноканальные методы (иммуноферментный анализ, хемилюминесцентный анализ) – позволяют детектировать IgE к одному аллергену. Мультипараметрические методы – определяют IgE к нескольким аллергенам одновременно (до 10). Многоканальные методы (технологии на основе микрочипов, ISAC) – обеспечивают одновременное выявление IgE к более чем 100 аллергенным компонентам [72].

В 1967 году шведская компания Phadia AB разработала методику аллергопроб *in vitro* для определения антител класса IgE. Впоследствии была создана технология UniCAP System, а в настоящее время её развитие продолжает компания Thermo Fisher Scientific. Тест-система ImmunoCAP позволяет обнаруживать малые концентрации IgE-антител в образце крови пациента благодаря использованию пористого вспененного материала, обеспечивающего увеличенную поверхность взаимодействия и высокую связывающую способность [94].

В России технология ImmunoCAP стала «золотым стандартом» лабораторной диагностики аллергии. Этот метод позволяет измерять уровни циркулирующих IgE, которые связываются с конкретным аллергеном или его молекулярным компонентом. Различают два типа анализа: одноканальный анализ (ImmunoCAP) – определяет уровни IgE против одного аллергена. Многоканальный анализ (ISAC –

ImmunoCAP Immuno Solid-phase Allergen Chip) – использует микрочип, содержащий 112 аллергенных компонентов из более чем 50 источников [1,100].

Одноканальный анализ ImmunoCAP основан на связывании аллерген-специфических IgE из сыворотки пациента с аллергенами, закреплёнными на целлюлозной полимерной матрице. Выявление IgE осуществляется с помощью антител, меченных ферментами (например, β -галактозидазой). При добавлении флуорогенного субстрата возникает флуоресценция, пропорциональная количеству аллерген-специфического IgE [27]. Результаты измеряются в килоюнитах антител на литр (kUA/L) [51].

Для получения количественных данных используется калибровочная кривая, откалиброванная по официальному стандарту ВОЗ для общего IgE. Это позволяет преобразовывать измеренные единицы флуоресценции в концентрацию IgE [53]. Преимуществами системы ImmunoCAP являются высокая чувствительность и специфичность: 93% и 95% соответственно [93]. Чувствительность достигается в 300 раз выше, чем у традиционного иммуноферментного анализа (ELISA) [11,16]. Для проведения анализа требуется минимальный объём образца (40 мкл сыворотки или плазмы). Точность результатов устанавливается диапазоне 0,1–100 kUA/L [72].

Технология ImmunoCAP внесла значительный вклад в диагностику аллергии на собак, позволяя определять специфический аллерген, вызывающий сенсibilизацию у пациента, выявлять перекрёстную аллергию и прогнозировать её риск, разрабатывать персонализированные стратегии лечения, а также оптимизировать аллерген-специфическую иммунотерапию (АСИТ).

Таким образом, развитие ImmunoCAP-диагностики позволило детализировать профили сенсibilизации пациентов и способствовало внедрению персонализированного подхода к терапии аллергии [47].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Дизайн исследования

Настоящая работа выполнена на базе лаборатории иммунопатологии Института молекулярной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Также в рамках исследования использовались материально-технические ресурсы Центра патофизиологии, инфектологии и иммунологии (Институт патофизиологии и алергоисследований) Венского медицинского университета (MUW).

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) – протокол № 04-22 от 16.02.2022.

Общий дизайн исследования разработан в соответствии с целями и задачами работы. Структура исследования представлена на рисунке 4.

На первом этапе исследования формировался банк сывороток пациентов с клиническими проявлениями аллергии на собак. Сбор образцов проводился на базе Государственном бюджетном учреждении здравоохранения Городской клинической больницы № 52 Института иммунологии ФМБА (Москва).

На втором этапе исследования были разработаны протоколы получения рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 для оценки IgE-реактивности у пациентов с аллергией на собак.

На третьем этапе была получена полная панель молекулярных аллергенов собак: Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6, которые получены в растворимой форме, а Can f 3 был выделен в нативной форме из сыворотки собак. Рекомбинантные аллергены собак были детально охарактеризованы методами: ПААГ-электрофореза, вестерн-блоттинга, масс-спектрометрии, кругового дихроизма и анализа высвобождения гистамина на модели базофильного лейкоза крысы (RBL).

На четвертом этапе алергокомпоненты Can f 1 – Can f 6 были биотинилированы для дальнейшей оценки IgE-реактивности с использованием иммунокэпов со стрептавидином.

На пятом этапе проводилась детекция аллергической сенсibilизации пациентов к алергенам собаки методом ImmunoCAP.

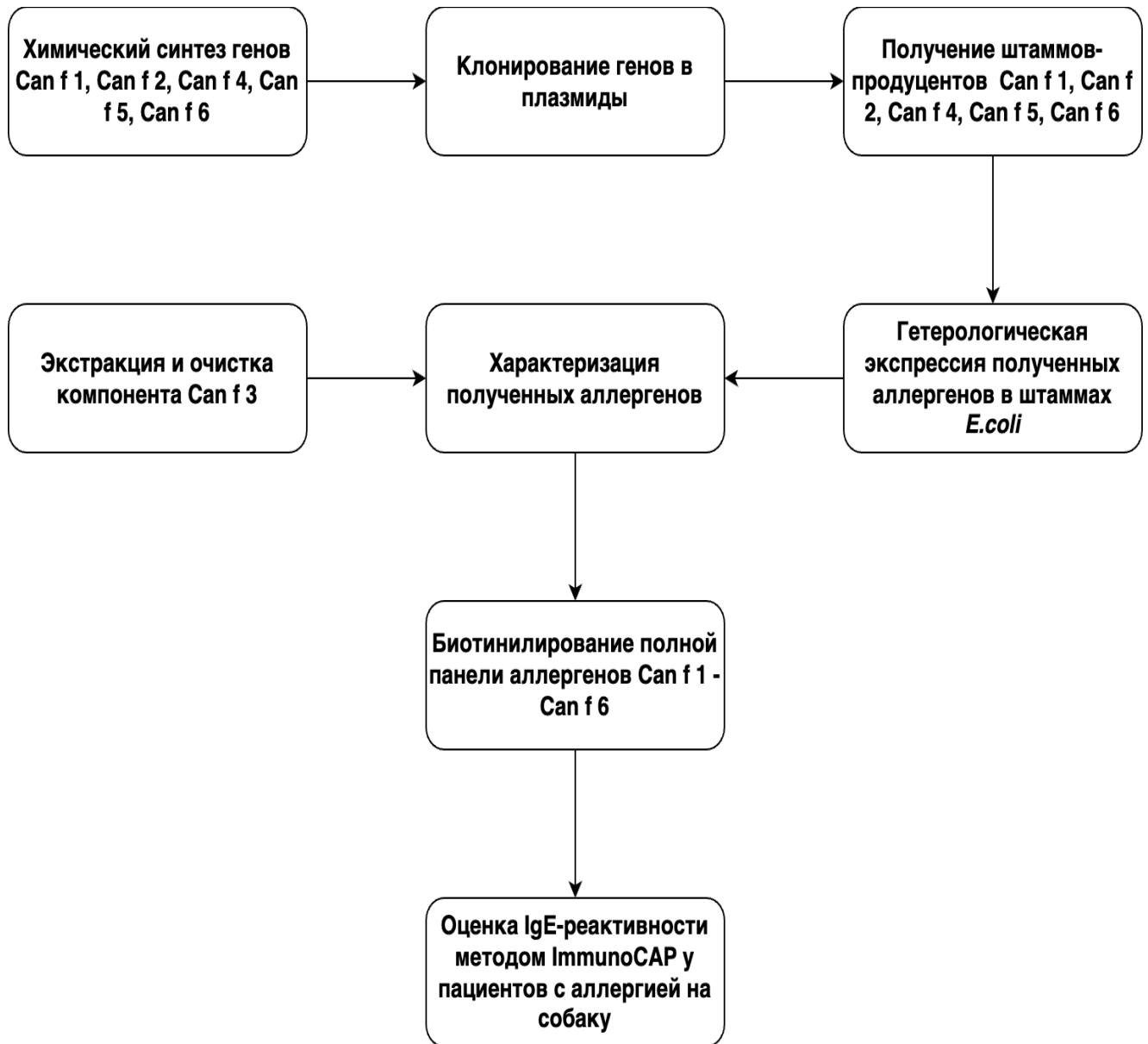


Рисунок 4 – Общй дизайн исследования

2.2. Реактивы и материалы используемые в исследовании

В работе использовали следующие реактивы: хлорид натрия (Sigma), хлорид кальция (Sigma), гидроксид натрия (Sigma), трисгидрохлорид аминотетан (Sigma), 14% соляная кислота (РОССИЯ), ледяная уксусная кислота (MERCK), 95% этанол (РОССИЯ), глицерин (Sigma), мочеви́на (Sigma), сульфат аммония (Sigma), хлорид магния (Sigma), цитрат натрия (Sigma), карбонат натрия (Sigma), фосфат натрия однозамещённый (MERCK), фосфат натрия двузамещённый (MERCK), лимонная кислота (Sigma), N,N-диметилформамид (Sigma), бромфеноловый синий (Sigma), полисорбат 20 (Sigma), бромистый этидий (MERCK), тритон X-100 (Sigma), додецилсульфат натрия (Sigma), этилендиаминтетрауксусная кислота (Sigma), ампициллин (Sigma), камамицин сульфат (Sigma), пропанол-2 (Sigma), дитиотреитол (Sigma), изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (Sigma), 30% раствор акриламида-бисакриламида (Biorad), ТЕМЕД (Sigma), персульфат аммония (Sigma), АТФ (Евроген), dNTP (Евроген), бычий сывороточный альбумин (Sigma), глутатион восстановленный (Sigma), глутатион окисленный (Sigma), 2-меркаптоэтанол (MERCK); Кумасси бриллиантовый синий R-250 (BioRad), агар-агар (MERCK), дрожжевой экстракт (Sigma), пептон бактериологический (MERCK), монофосфат калия (Sigma), набор для выделения плазмид Plasmid miniprep (Евроген), имидазол (MERCK), пероксид водорода 37% (Sigma), L-аргинин (NeoFroxx), глицин (Sigma), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоно́вая кислота (Sigma), микробиологическая среда SOC (Invitrogen), аффинный хроматографический сорбент Ni-NTA (QIAGEN), 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфо́кислоты) диаммониевая соль (Sigma-Aldrich), n-гидроксисукцинимидный эфир биотинамидогексаноил-6-аминогексановой кислоты (Sigma), лизоцим (Sigma-Aldrich), ДНКазы I (Millipore), анти-человеческое IgE антитело конъюгированное с пероксидазой хрена (Abcam), авидин конъюгированный с пероксидазой хрена (BD Pharmingen), моноклональные мышинные антитела к Can f 5, крысиные моноклональные антитела к мышинным IgG1 антителам (BD Bioscience). Калибраторы для sIgE от 0 до 100 kUA/L

(ImmonoCAP®), отмывающий раствор (ImmonoCAP®), проявляющий раствор (ImmonoCAP®), раствор для остановки реакции (ImmonoCAP®), конъюгат для общего IgE (ImmonoCAP®), раствор для контроля калибровочной кривой (ImmonoCAP®) и иммунокэпы со стрептавидином (ImmonoCAP®).

В работе использовали следующие материалы: нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0.45 мкм (Millipore MERCK); Ватман 3ММ (Whatman); фильтры с диаметром пор 0.45 и 0.22 мкм для стерилизации растворов (Millipore MERCK), набор для хроматографической очистки (QIAGEN), концентраторы центрифужные 10 кДа (MERCK), диализные кассеты Slide-A-Lyzer объемом 0,5 и 10 мл (Thermo Fisher Scientific), набор для определения концентрации белков micro BCA (Thermo Fisher Scientific).

2.3. Бактериальные штаммы и плазмидные векторы

В данном исследовании были использованы следующие бактериальные штаммы *Escherichia coli*:

1. XLI-Blue [recA1, lac-, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1 /F' proA+B+, lacIq, lacZΔM15, Tn10];
2. BL21-Gold (DE3) [*E. coli* B F- dcm+ Hte ompT hsdS(rB- mB-) gal λ (DE3) endA Tetr];
3. Rosetta-gami B(DE3) [F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522::Tn10 trxB pRARE (CamR, KanR, TetR)];
4. SHuffle T7 [F' lac, pro, lacI^q / Δ(ara-leu)7697 araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1 Δ(phoA)PvuII phoR ahpC* galE (or U) galK λatt::pNEB3-r1-cDsbC (Spec^R, lacI^q) ΔtrxB rpsL150(Str^R) Δgor Δ(malF)3].

В качестве плазмидных векторов были использованы pET27b (Novagen), pET17b (Novagen), pET22b(Novagen), pET28/22.

2.4. Лабораторное оборудование

Сканирующий спектрофотометр SmartSpec Plus (BioRad), шейкер инкубатор с охлаждением (New Brunswick, центрифуга 5810R (Eppendorf), планшетный ридер CLARIOstar (BMG Labtech), электрофорезная вертикальная камера Mini-Protean Tetra (Biorad), система мокрого блоттинга Criterion Blotter (Biorad), электрофорезная горизонтальная камера (Biorad), ультразвуковой гомогенизатор (Cole Parmer), гомогенизатор механический ULTRATURAX (IKA), УФ-трансиллюминатор (BioRad), термостат программируемый «Терцик» (ДНК-Технология), термостат «Гном» (ДНК-технология), автоматические микропипетки (Eppendorf), магнитная мешалка (IKA), весы аналитические (mettler toledo), спектрофотометр NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), система геледокументирования Gel Doc XR+ (Biorad), анализатор иммунологический Phadia 100 (Thermo Fisher Scientific).

2.5. Образцы сывороток пациентов с аллергией на собаку

В исследование были включены 86 пациентов с аллергией на собак, 6 здоровых доноров и 5 пациентов без признаков аллергии на собак. Биобанк сывороток пациентов с аллергией на собак был сформирован в лаборатории иммунопатологии Сеченовского университета. Набор пациентов осуществлялся при Государственном бюджетном учреждении здравоохранения Городская клиническая больница № 52 Департамента здравоохранения города Москвы. Диагноз «аллергия на собак» был верифицирован на основании специфических клинических проявлений на собаку (бронхиальная астма, дерматит, аллергический риноконъюнктивит), а также результатов кожных аллергологических проб с экстрактами, содержащими компоненты шерсти и перхоти собак.

Все пациенты прошли анкетирование, включавшее персональные данные и анамнез заболевания. Все участники исследования подписали информированное согласие на участие в эксперименте.

Взятие клинического материала проводилось квалифицированным персоналом путем венепункции с забором 2 – 4 мл периферической венозной крови в вакуумную пробирку с разделительным гелем для получения сыворотки.

После взятия крови проводилось центрифугирование при 3000 об/мин, после чего полученная сыворотка замораживалась и хранилась при -20°C.

2.6. Разработка штаммов продуцентов *E. coli* несущие целевые гены Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 6

Плазмидные векторы, содержащие целевые гены Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 были получены из центра патофизиологии, инфектологии и иммунологии (институт патофизиологии и алергоисследований) Венского медицинского университета. Конструирование плазмид выполнено немецкой компанией ATG:biosynthetics GmbH. В работе использовали плазмиды pET27b, pET22b и pET17b. Плазмидные карты представлены на рисунках 5 – 7.

В плазмиду pET27b с сайтами рестрикции NdeI – XhoI клонировали синтетические гены Can f 4 (GU132996.1) и Can f 6 (HE653774.1). В плазмиду pET17b с сайтами рестрикции *NdeI - XhoI* клонировали синтетический ген Can f 1. В плазмиду pET22b с сайтами рестрикции *NdeI - EcoRI* клонировали синтетический ген Can f 2 (AF027178.1). Нуклеотидные последовательности генов, кодирующие алергокомпоненты Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 были выбраны на основании учетного номера в базе данных GenBank. Все нуклеотидные последовательности были оптимизированы, редкие кодоны заменены на кодоны с большей частотой встречаемости, к каждому из генов были добавлены С-концевые гексагистидиновые метки. Вставки целевых генов Can f 1 – Can f 6 с искомыми нуклеотидными последовательностями были подтверждены методом автоматического секвенирования по Сэнгеру (таблица 5).

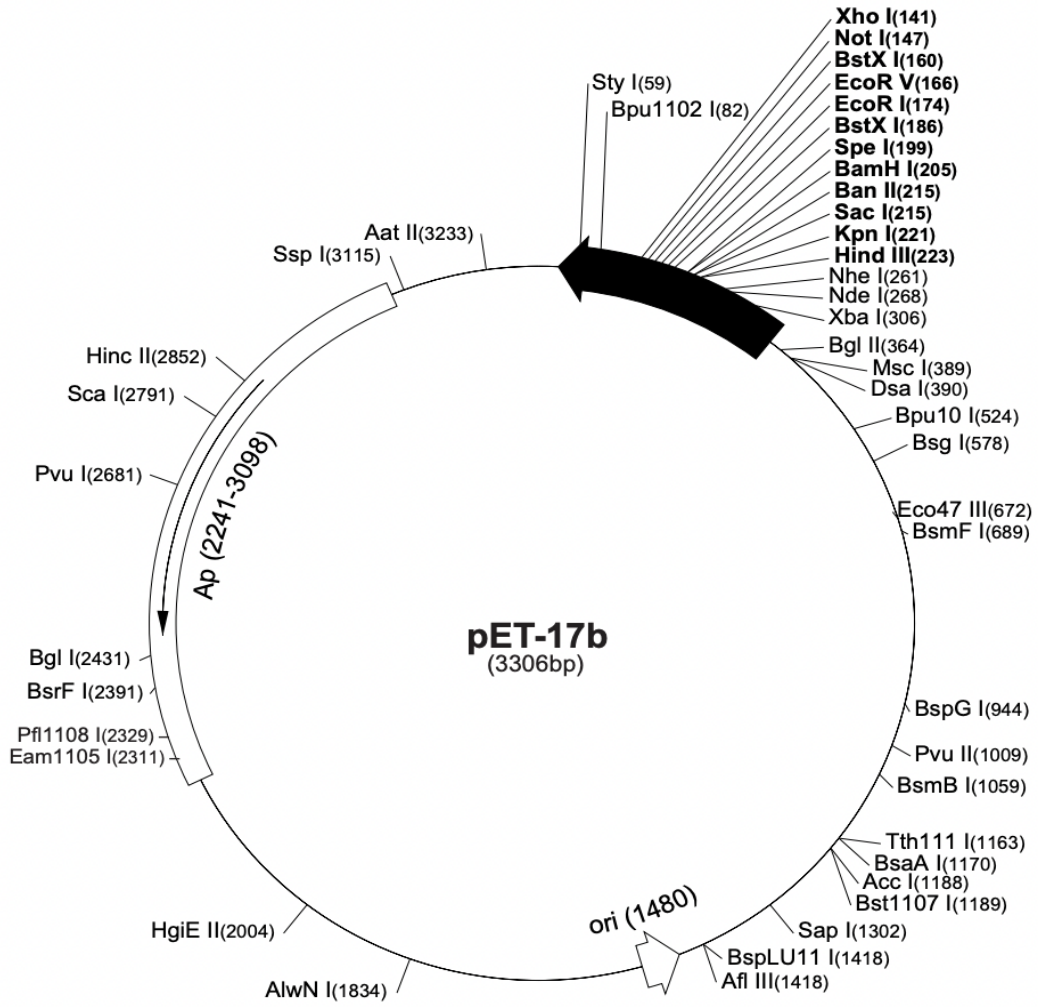


Рисунок 5 – Плазмидная карта pET17b

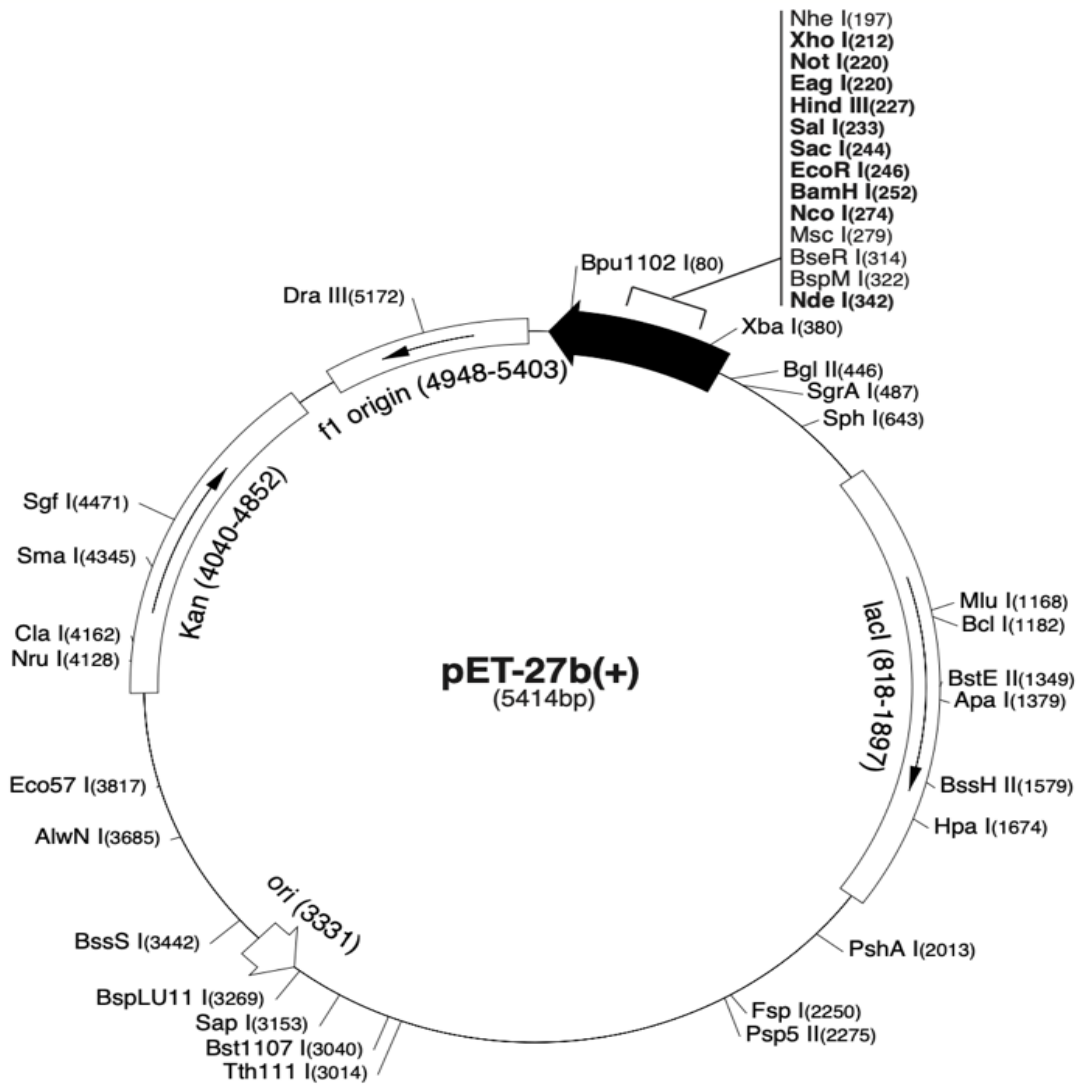


Рисунок 6 – Плазмидная карта pET27b

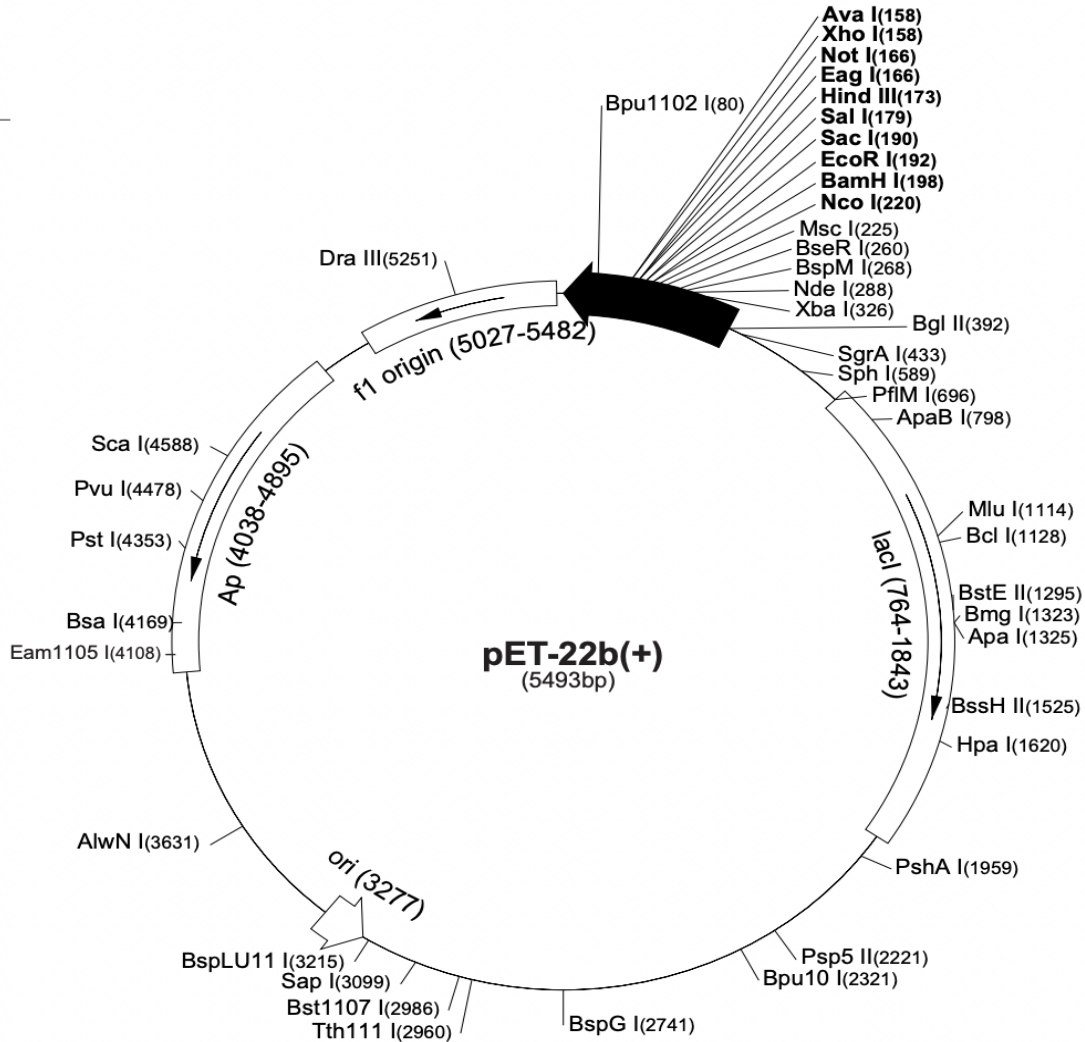


Рисунок 7 – Плазмидная карта pET22b

Для наработки плазмидной ДНК векторные конструкции с целевыми генами Can f 1, Can f 2, Can f 4 и Can f 6 были трансформированы в бактериальный штамм *E. coli* XL-1 Blue. Для трансформации 1 мкл ДНК добавлялся к 50 мкл компетентных клеток XL-1 Blue в течение 30 минут на льду. Далее выполнялся тепловой шок путем инкубации клеточной суспензии при температуре 42°C. После чего клеточную суспензию инкубировали на льду в течение 2 – 3 минут и вносили 500 мкл супербогатой питательными веществами микробиологической среды (SOC). Клеточные суспензии инкубировали в течение часа в терморегулируемом шейкере инкубаторе при температуре 42°C и постоянном перемешивании 250 оборотов в минуту. Полученные клеточные суспензии высевали на агаризованные чашки Петри с селективирующим антибиотиком канамицином или ампицилином в

концентрации 50 мг/л и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующее утро полученные колонии инокулировали в 2 мл питательной среды Terrific в течение ночи при 37°C и постоянном перемешивании 250 оборотов в минуту. Из клеточных осадков выделяли плазмидную ДНК, определяли концентрацию и секвенировали методом автоматического секвенирования по Сэнгеру для подтверждения правильности полученных синтетических последовательностей генов Can f 1, Can f 2, Can f 4 и Can f 6.

Для экспрессии рекомбинантных аллергенов использовали следующие штаммы компетентных клеток *E. coli*: BL21-Gold (DE3), Rosetta-gami B(DE3). В таблице 5 представлены аллергены собак, которым соответствуют экспрессионные штаммы и плазмидные векторы, использованные в настоящем исследовании.

Таблица 5 – Экспрессионные штаммы и плазмидные вектора

Аллерген	Штамм <i>E. coli</i>	Плазмидный вектор	Селектирующий антибиотик
Can f 1	BL21-Gold (DE3)	pET17b	Ампициллин
Can f 2	Rosetta-gami B(DE3)	pET22b	Ампициллин
Can f 4	BL21-Gold (DE3)	pET27b	Канамицин
Can f 6	BL21-Gold (DE3)	pET27b	Канамицин

Компетентные клетки BL21-Gold (DE3), Rosetta-gami B(DE3) и Shuffle T7 размораживали и далее использовали для трансформации генами Can f 1, Can f 2, Can f 4 и Can f 6. На следующее утро после селекции, полученные клоны инкубировали в среде LB и наращивали до оптической плотности (ОП) 0.5 оптических единиц (ОЕ) после чего трансформированные штаммы продуценты замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

2.7. Разработка штаммов продуцентов *E. coli* несущие целевые гены Can f 5

Плазмидная конструкция Can f 5 с последовательностью дикого типа (Y00751.1) была получена из центра патофизиологии, инфектологии и иммунологии (институт патофизиологии и аллергоисследований) Венского медицинского университета, которую клонировали в канамицин устойчивую

в питательной среде LB с добавлением канамицина 50 мг/л и ампициллина 50 мг/л соответственно при температуре 37⁰С в течение 3 часов. Для аналитической экспрессии добавляли 1 мМ IPTG до достижения ОП 0.8 – 1.0 ОЕ, после чего клеточные суспензии инкубировали в течение 16 часов при постоянной температуре 18⁰С. После индукции клеточные суспензии осаждали центрифугированием и отбирали пробы для ПААГ гель электрофореза.

2.8. Экспрессирование рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6

Штаммы продуцентов рекомбинантных белков Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 высевали на агаризованные чашки Петри с соответствующими селективирующими антибиотиками и выращивали в течение ночи при 37⁰С. На следующее утро одиночные колонии инокулировали в 450 мл питательной среды SB с добавлением селективирующего антибиотика канамицина или ампициллина в концентрации 50 мг/л и инкубировали при 37⁰С и постоянном перемешивании 250 оборотов в минуту. При достижении ОП 0.8 – 1.0 ОЕ отбиралась аликвота для контроля до начала индукции синтеза белка. После чего вносился индуктор синтеза белка IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Клеточные суспензии инкубировали в течение ночи при 18⁰С. После индукции отбирались пробы для дальнейшего проведения ПААГ электрофореза. Полученные осадки осаждали центрифугированием при 13.000 оборотах в минуту, культуральная жидкость сливалась. Клеточные осадки хранили при -20⁰С.

Для выделения целевых аллергенов бактериальные осадки размораживали на льду в течение 30 минут и инкубировали в лизисном буфере (50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, рН 8) с добавлением лизоцима (1 мг/мл) и ДНКазы I (5 мкг/мл). Лизированные бактериальные осадки дополнительно разрушали ультразвуком с помощью сонотрода с циклом в 10 секунд и мощностью 200 – 300W. Клеточный осадок осаждали центрифугированием при 10,000 оборотах в минуту с постоянной поддержкой температурного режима в 4⁰С. Супернатант собирали и инкубировали с хроматографическим сорбентом Ni-NTA в течение часа

при температуре 4⁰С для проведения металл-хелатной аффинной хроматографии по протоколу QIAGEN для очистки белков в растворимой форме. Связывающая способность Ni-NTA составляла 5-10 мг/мл. После инкубации сорбент наносили на одноразовую колонку QIAGEN. После нанесения сорбента на колонку открывали заслонку, собирали фракцию проскока и брали аликвоту для ПААГ электрофореза. Сорбент промывали дважды промывочным буфером (50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, рН 8). Фракции отмывки собирали и отбирали аликвоту для ПААГ электрофореза. Далее проводили элюирование белка с сорбента с помощью элюирующего буфера (50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазол, рН 8). Собирали 5 фракций элюата в стерильные пробирки и отбирали аликвоту для ПААГ электрофореза. После верификации наличия аллергенов элюаты объединяли и диализировали в диализных буферах (таблица 6).

Таблица 6 – Буферные растворы для диализа аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6

Аллерген	Буфер для диализа
1	2
Can f 1	50 мМ ХЕПЕС, рН 8, 0,1 М KCl
Can f 2	Трис-основание, рН 7,2
Can f 4	20 мМ Трис-основание, 100 мМ NaCl, рН 7,4
Can f 5	20 мМ ПБС, рН 8, 0,15 М NaCl
Can f 6	ПБС, рН 7,4

2.9. Оценка реактивности аллерген-специфических IgE-антител человека к Can f 5 с помощью Вестерн-блоттинга

Для оценки физиологической активности полученных в *E. coli* вариантов рекомбинантного Can f 5 по его связыванию с аллерген-специфическими IgE антителами человека использовали клеточные осадки *E. coli* Rosetta-gami B(DE3) содержащие следующие варианты рекомбинантного белка Can f 5: Can f 5 с

последовательностью дикого типа, рекомбинантный Can f 5 с дополнительным аминокислотным остатком аспарагиновой кислоты на N-конце, рекомбинантный Can f 5 с N-концевым гексагистиридиновым тэгом и рекомбинантный Can f 5 без лидерного пептида на N-конце. В качестве положительного контроля использовали очищенный рекомбинантный Can f 5. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку крови человека без аллергии на собаку, а также образец без сыворотки крови человека. Для анализа использовались 3 клона клеточных осадков *E. coli* до индукции и после индукции. После переноса белков нитроцеллюлозные мембраны инкубировали в течении 12 часов в Gold буфере (42 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 6,4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5% Tween 20; 0,5% БСА; 0,05% NaN_3) и вносили сыворотку 5 пациентов с аллерго-сенсibilизацией на аллергокомпонент собак Can f 5. В качестве отрицательных контролей использовали сыворотку здорового добровольца в разведении 1:5 и фосфатно-солевой буфер. Инкубацию проводили в течении 12 часов при температуре 4°C. Детекция проводилась с помощью анти-IgE-специфических антител, радиоактивно меченных изотопами ^{125}I в течении 12 часов при комнатной температуре. После детекции мембраны отмывали Gold буфером и инкубировали с радиографической пленкой (ThermoFisher Scientific CL-XPosure Film) в течении 5 дней при -80 °C, с последующим проявлением рентгеновским излучением с помощью автордиографии (Kodak, X-OMAT).

2.10. Получение Can f 3 в нативной форме

Аллергокомпонент Can f 3 получали в центре патофизиологии, инфектологии и иммунологии (институт патофизиологии и аллергоисследований) Венского медицинского университета из сывороток собак с помощью метода эксклюзионной хроматографии с использованием колонки 16/60 Superdex 200 пкг, GE Healthcare уравновешенная ПБС, pH 7,4. Фракции, соответствующие альбумину собак 66 кДа собирали, объединяли и концентрировали.

2.11. Определение вторичной структуры аллергенов

Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6

Для изучения вторичной структуры полученных рекомбинантных алергокомпонентов использовали метод спектроскопии кругового дихроизма (CD). Анализ был проведен в Венском медицинском университете на спектрополяриметре Jasco J-810 (Japan Spectroscopic Co., Tokyo, Japan). Для начала определяли концентрацию белков Can f 1 – Can f 6 с помощью метода micro BCA (Thermo Fisher Scientific). Для анализа использовали прямоугольные кварцевые кюветы с толщиной слоя 0,2 см. Концентрация очищенных аллергенов для исследования составляла 0,12 мг/мл. Все эксперименты проводили при температуре 20°C в буфере ПБС, pH 7,4. Исследование выполняли в УФ области спектра (от 200 нм до 240 нм) с разрешением 0,5 нм и скоростью сканирования 50 нм/мин. Конечные результаты спектров были нормализованы путем вычета спектров буферного раствора. Анализ вторичной структуры белков по спектрам кругового дихроизма был выполнен с использованием алгоритмов расчета CONTINLL и CDSSTR с сайта DICROWEB [31,52].

2.12. Анализ дегрануляции базофилов

Для оценки аллергенной активности рекомбинантных аллергенов использовали клеточную линию базофильного лейкоза (RBL), экспрессирующая на поверхности высокоаффинный IgE рецептор человека (FcεRI). Сыворотки пациентов с аллергией на собаку и здорового контроля в разведении 1:10 инкубировали в CO₂-инкубаторе с содержанием 7% CO₂ с RBL клетками в концентрации 1×10^5 клеток на лунку планшета в течение ночи 24 часов при температуре 37°C. Для индукции дегрануляции базофилов перекрестно связанные IgE антитела с рецептором FcεRI инкубировали с рекомбинантными аллергенами Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 в концентрациях 0,1; 1; 10, 100 нг/мл в течение часа. Далее проводили инкубацию супернатантов с флюорогенным

субстратом 4-MUF-NAG (4-метилумбеллиферил N-ацетил- β -D-глюкозаминид) в цитратном буфере (0,1 М $C_6H_8O_7$, pH 4,5) в течение часа при температуре 37 °C и анализировали β -гексозаминидазную активность. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл глицинового буфера (0,2 М глицин, 0,2 М NaCl, pH 10,7) и детектировали флуоресценцию при длине волн 360 нм и 465 нм. Дегрануляцию оценивали по высвобождению β -гексозаминидазы в супернатант. В качестве контроля дегрануляции базофилов использовали значения β -гексозаминидазной активности, полученные при стимуляции тучных клеток сывороточным альбумином человека.

2.13. Анализ ингибирования IgE методом иммуноферментного анализа

Для демонстрации того, что пациенты с аллергией, сенсibilизированные как на Can f 5, так и на другие алергокомпоненты отличные от алергенов собаки могут реагировать на углеводные кросс-реактивные детерминанты (CCD) были протестированы 110 сывороток пациентов, которые были предоставлены Венским медицинским университетом.

Очищенный рекомбинантный алерген Can f 5, экспрессированный в дрожжах, а также блокатор CCD были приобретены у компании Rekom Biotech (Гранада, Испания). Для постановки ИФА планшеты инкубировали очищенным алергеном Can f 5, полученным с использованием дрожжевой экспрессионной системы и *E. coli*, в концентрации 2 мкг/мл в бикарбонатном буфере в течение ночи при температуре 4 °C.

После инкубации лунки промывали трижды раствором ПБС с 0,5% Твин-20 (ПБС-Твин) и блокировали 2% раствором БСА в ПБС-Твин в течение 2,5 часов при 37 °C, а затем дополнительно 2,5 часа при 4 °C. Сыворотки пациентов разводили в соотношении 1:10 в 1% БСА/ПБС-Твин – либо без добавок, либо с добавлением CCD-блокатора в соответствии с инструкцией производителя – и инкубировали с алергенами в течение ночи при 4 °C.

После завершения инкубации планшеты пять раз промывали ПБС-Твин и инкубировали конъюгированными антителами мечеными пероксидазой хрена

(HRP) против человеческого IgE (KPL, Гейтерсберг, Мэриленд, США), разведёнными в соотношении 1:2500 в 1% БСА-ПБС-Твин. Инкубация проводилась 1 час при 37 °С и затем 1 час при 4 °С. После трёхкратной промывки в планшеты добавляли раствор хромогенного субстрата АВТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты), Sigma-Aldrich) в буфере на основе лимонной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм (референтная длина волны – 492 нм) с использованием спектрофотометра Tecan Infinite (Thermo Scientific, Multiskan GO).

2.14. Биотинилирование полной панели рекомбинантных аллергенов

Can f 1 - Can f 6

Для количественной детекции специфических IgE антител использовали метод ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific/Phadia, Uppsala, Sweden). С этой целью использовали биотинилированные рекомбинантные аллергены и иммунокапы, связанные со стрептавидином (ImmunoCAP Ro212). Для удаления буферных солей, загрязняющих примесей, восстанавливающих агентов, консервантов и реагентов детекции осуществляли диализ концентрированных растворов рекомбинантных аллергенов Can f 1 - Can f 6 с использованием кассет для диализа объемом 0,5 мл (Slide-A-Lyzer, Thermo Fisher Scientific) с размером пор 3,5 кДа (3,5K MWCO). Диализ проводили против 1 литра буферного раствора (0.1 М NaHCO₃, 1 М NaCl, pH 8) в течение 8 часов при температуре 4°C. Диализованные белки извлекали из кассет и измеряли их концентрацию с помощью бицинхониновой кислоты (microBCA). После этого осуществляли биотинилирование аллергенов.

Для биотинилирования готовили свежий раствор биотина (Biotin-X-X-NHS, биотинамидогексаноил-6-аминогексановая кислота N-гидроксисукцинимидный эфир) в диметилформамиде с конечной концентрацией 10 мг/мл. Ввиду слабой растворимости биотина в воде или водных буферах его растворение проводили в органическом растворителе. Эфир биотина N-гидроксисукцинимид (NHS) взаимодействует с первичными аминогруппами белков, формируя стабильные амидные связи. Исследуемые аллергены Can f 1 - Can f 6 содержат остатки лизина,

являющиеся мишенью для мечения биотином. Выбор лизина в качестве мишени обусловлен его широким распространением в белках и тем, что его остатки имеют открытую позицию для взаимодействия с биотином. При биотинилировании происходит включение 3–5 молекул биотина на молекулу белка, причем степень включения биотина прямо пропорциональна молекулярной массе белка.

После подготовки концентрированного раствора биотина к каждому образцу аллергена добавляли 5-кратный избыток биотина. Для расчета объема биотина для биотинилирования аллергенов использовали формулу 1.

Формула 1:

$$V(\text{биотина}) = C(\text{ал}) \div Mw(\text{ал}) \times \lambda \times V(\text{ал}) \div (Mw(\text{Б}) \div C(\text{Б}))$$

- V (биотина) – объем биотина в мкл;
- Mw- молекулярная масса;
- λ - кратный молярный избыток биотина.

После расчета объема биотина в смесь добавляли аллергены, тщательно их перемешивали и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После завершения инкубации проводили двукратный диализ раствора против ПБС для удаления не связавшихся молекул биотина и определяли конечную концентрацию биотинилированных аллергенов методом microVISA. Для оценки эффективности биотинилирования аллергенов использовали метод «сэндвич-ИФА». Для детекции проводили инкубацию с пероксидазой хрена конъюгированной с авидином, после чего вносили раствор АБТС и измеряли ОП каждые 5 минут в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте.

2.15. Оценка профиля сенсibilизации к молекулярным аллергенам

Can f 1 – Can f 6 у пациентов с аллергией на собаку

Оценка IgE-сенсibilизации проводилась с помощью автоматического иммунологического анализатора Phadia 100, который используется для обработки образцов, реагентов и результатов исследований с помощью встроенного специального программного обеспечения (Phadia Information Data Manager (IDM)). Инструмент молекулярной алергодиагностики Phadia используется совместно с

«иммунокэпами». Иммунокэп представляет собой твердую фазу, содержащая иммобилизованные аллергены на нитроцеллюлозной губке сферической формы. Иммунокэпы поставляются производителем в специальном носителе, содержащий 10 или 16 целлюлозных полимеров с аллергеном. В данной работе использовали иммунокэп связанный с стрептавидином (ImmunoCAP, Ro212). Анализатор Phadia 100 производит автоматическое проведения всех процессов иммуноанализа (инкубация, пипетирование, отмывание, измерение, выведение результатов). Для выполнения исследования использовали коммерческие реагенты совместимые с Phadia 100. Для анализа использовали 40 мкл сыворотки пациентов без разведения. В анализ было включено 86 пациентов с аллергией на собаку, 6 здоровых доноров и 5 пациентов без признаков аллергии на собаку. Иммунокэпы со стрептавидином помещали в конвейерную часть прибора с последующим внесением раствора биотинилированных аллергенов по 0.04 мг/мл на один иммунокэп. Далее загружали коммерческие реагенты, заявленные производителем для данного типа анализа. После загрузки необходимых реагентов и иммунокэпов запускали иммуноанализ. Для анализа выбрали программу для определения стрептавидина (Ro212) с целью детекции и количественного подсчета sIgE у группы исследуемых пациентов в международных единицах кЕдА/л.

2.16. Методы статистической обработки результатов исследования

Для статистической обработки данных в данном исследовании использовались программные пакеты GraphPad Prism (версия 10) и Python (версия 3.12). GraphPad Prism применялся для расчета описательной статистики, проведения корреляционного анализа и оценки статистической значимости результатов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Процесс получения рекомбинантных белков является важнейшей частью молекулярной биологии и биотехнологии. Технология получения рекомбинантных аллергенов играет ключевую роль в производстве целевых продуктов, имеющих значительное значение для медицины и лабораторной диагностики. Среди доступных систем для клонирования и экспрессии целевых белков гетерологическая экспрессия в клетках *Escherichia coli* (*E. coli*) является наиболее предпочтительной. Это обусловлено высокой эффективностью получения рекомбинантных белков, низкими производственными затратами, простотой масштабирования процесса синтеза и хорошо изученной генетикой организма.

Основными недостатками системы *E. coli* являются отсутствие посттрансляционных модификаций, неоптимальный фолдинг для некоторых классов белков и образование нерастворимых агрегатов – телец включения. Несмотря на обширные знания о молекулярной биологии *E. coli*, не каждый синтетический ген может быть эффективно экспрессирован в этих клетках. К основным проблемам, связанным с экспрессией синтетических белков, относятся: нарушение синтеза мРНК из-за структурных особенностей последовательности или размера кодируемого полипептида; низкая эффективность транскрипции мРНК при наличии редких кодонов; потенциальная токсичность продуцируемого белка; неоптимальный фолдинг белков, особенно при наличии дисульфидных связей или сайтов гликозилирования.

Тем не менее, возможность интеграции крупных фрагментов чужеродной ДНК с использованием плазмидных векторов, простота манипуляций с генными последовательностями и регулирование уровня экспрессии целевых генов с помощью подбора промоторов обеспечивают широкое распространение этой системы.

В данном исследовании использовались экспрессионные штаммы *E. coli* BL21(DE3) Gold и Rosetta. Штамм *E. coli* BL21(DE3) и его производные являются одними из наиболее популярных штаммов-носителей для гетерологичной

экспрессии рекомбинантных генов. Они содержат фрагмент DE3, кодирующий РНК-полимеразу фага T7, а также мутации в генах протеиназ Lon и OmpT, что снижает деградацию рекомбинантных белков. Известно, что данные штаммы обеспечивают высокий уровень экспрессии целевого белка при добавлении индуктора IPTG.

В качестве плазмидных векторов использовались pET17b, pET27b и pET22b. Экспрессионная система, основанная на высокоселективной РНК-полимеразе бактериофага T7, состоит из двух основных компонентов: вектора серии pET и модифицированного штамма *E. coli*, содержащего DE3 фрагмент бактериофага T7. Векторы содержат следующие элементы: ген *lacI*, кодирующий *lac*-репрессор; T7-промотор, специфичный для T7-РНК-полимеразы; *lac*-оператор; полилинкер; ген устойчивости к ампициллину (для pET17b) или канамицину (для pET27b); точку начала репликации ColE1 *ori*.

Основной задачей данного исследования было получение аллергокомпонентов преимущественно в растворимой форме, так как такие рекомбинантные белки обладают нативной конформацией и способны связываться с антителами. Антитела распознают как линейные, так и пространственные эпитопы, при этом их связывание эффективно только при наличии нативной структуры белка.

В рамках исследования были получены аллергены Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 в растворимой форме. Ключевой задачей стало получение правильно сложенных белков с нативной пространственной укладкой, что критически важно, поскольку аллерген-специфические антитела способны распознавать линейные или пространственные эпитопы только при сохранении нативной структуры белка [69].

3.1. Разработка штаммов продуцентов аллергенных компонентов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6

Гены, кодирующие рекомбинантные Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6, были получены из Венского медицинского университета и клонированы в плазмидные векторы (таблица 7).

Таблица 7 – Сайты рестрикции и плазмидные векторы

Синтетический ген	Плазмидный вектор	Сайты рестрикции
Can f 1	pET17b	NdeI - XhoI
Can f 2	pET22b	NdeI - EcoRI
Can f 4	pET27b	NdeI - XhoI
Can f 5	pET27b	NdeI - EcoRI
Can f 6	pET27b	NdeI - XhoI

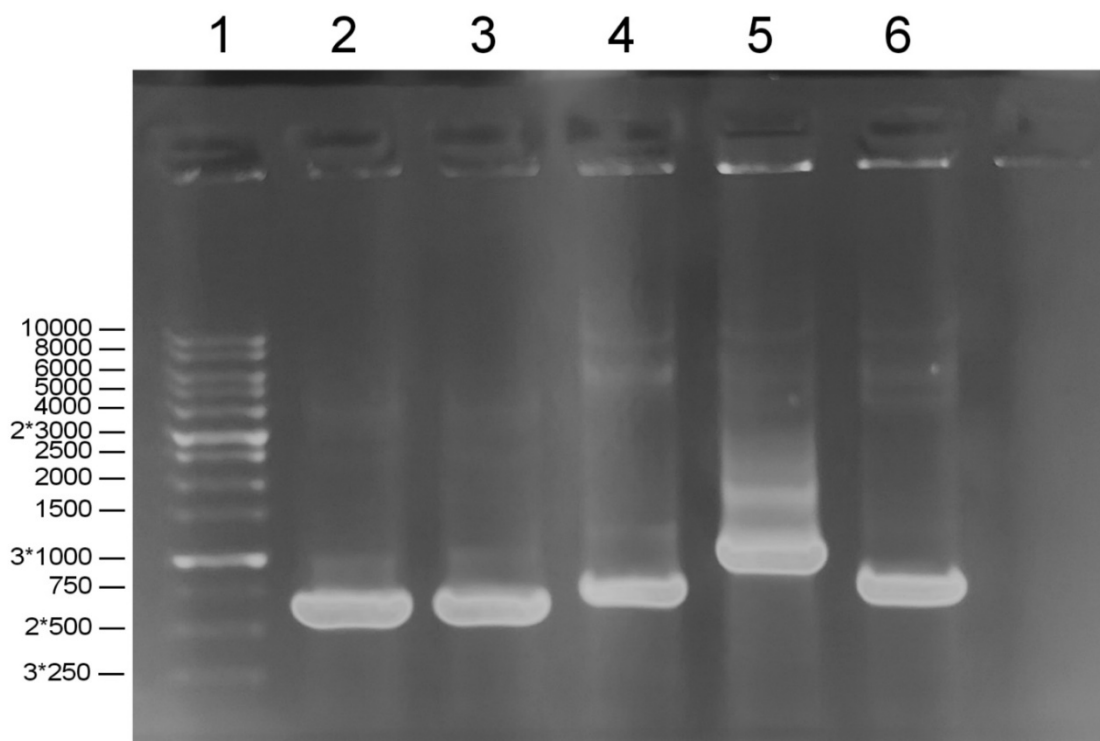
Для упрощения процесса выделения рекомбинантных аллергенов все экспрессионные конструкции были сконструированы с нуклеотидной последовательностью, кодирующей гексагистидиновую метку (His₆-tag) на C-конце белков. Данная метка обеспечивает возможность эффективной очистки рекомбинантных белков с использованием методов аффинной хроматографии на никельсодержащих смолах.

Для подтверждения присутствия целевых вставок в плазмидных векторах был использован метод агарозного гель-электрофореза с использованием стандартных праймеров, специфичных для pET-экспрессионной системы. Рассчитанные длины ампликонов составили: 661 пар оснований (п.о.) для Can f 1; 773 п.о. для Can f 2; 815 п.о. для Can f 4; 1118 п.о. для Can f 5; 866 п.о. для Can f 6. Все ампликоны соответствовали ожидаемым размерам, что подтверждает корректность клонирования целевых генов (рисунок 8).

Для подтверждения точности нуклеотидных последовательностей целевых генов был применён метод автоматического секвенирования по Сэнгеру.

Результаты секвенирования представлены в таблице 8 и демонстрируют полное соответствие ожидаемым последовательностям.

Аминокислотные последовательности рекомбинантных аллергенов приведены в таблице 9 и соответствуют нативным структурам, необходимым для дальнейших функциональных исследований.



Примечание: 1 - маркер молекулярной массы; 2 - 6 – ампликоны генов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6

Рисунок 8 – Агарозный гель электрофорез плазмид Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5, Can f 6

Таблица 8 – Нуклеотидные последовательности синтетических генов

Аллерген	Нуклеотидная последовательность генов
1	2
Can f 1	ATGACGGCAGACCAGGAAGTGCCGGAAAAACCGGATAGCGTACTCCG ATGATCCTGAAAGCGCAGAAGGGCGGCAACCTGGAAGCAAAAATTACC ATGCTGACCAACGGCCAGTGCCAGAACATCACCGTCGTGCTGCACAAA CCTCTGAACCGGGTAAATACACGGCGTATGAAGGTCAGCGTGTAGTTTT ATCCAGCCGAGCCCGGTGCGCGACCACTACATTCTGTATTGCGAAGGTG AACTGCACGGTCGTCAAATCCGTATGGCAAACTGCTGGGTGCTGATCC GGAACAGTCTCAAGAAGCTCTGGAAGATTTCTGGGAATTCTCCCGTGCG AAAGGTCTGAATCAGGAAATCCTGGAACTGGCGCAATCTGAAACCTGTA GCCCGGGCGGCCAGCACCATCACCACCACCATTA

Продолжение таблицы 8

1	2
Can f 2	<p>ATGCAGGAAGGCAACCACGAAGAACCACAGGGTGGCCTGGAAGAAGTGA AGCGGTTCGCTGGCACTCCGTTGCACTGGCGTCTAACAAGTCTGACCTGAT CAAACCGTGGGGCCACTTTCGTGTCTTCATCCACAGCATGTCCGCGAAAG ATGGTAACCTGCATGGTGATATCCTGATCCCGCAAGACGGTCAGTGCGA AAAAGTATCCCTGACTGCATTCAAAACCGCCACCAGCAACAAATTCGAC CTGGAATATTGGGGCCATAACGATCTGTACCTGGCTGAAGTTGACCCGA AGTCTTACCTGATTCTGTACATGATTAACCAGTATAACGACGATACCTCC CTGGTGGCTCATCTGATGGTGCGTGACCTGTCTCGTCAACAGGATTTCT GCCGGCGTTTGAAAGCGTGTGTGAAGACATCGGCCTGCACAAAGATCAG ATTGTTGTAAGTACTGAGCGATGATGACCGCTGCCAGGGTTCTCGTGACCACCA TCACCATCACCCTAA</p>
Can f 4	<p>ATGCAACTGCCGCTGCCGAATGTGCTGACCCAAGTCTCTGGCCCGTGGA AAACCCTGTATATCTCGTCGAACAACCTGGACAAAATTGGCGATAACGG CCCGTTTCGTATTTATATGCGCGGTATTAATGTGACATCCCGCGTCTGA AAATGAGCTTTAACTTCTACGTGAAAGTTGATGGCGAATGCGTTGAAAA CAGCGTCGGCGCATCTATTGGTTCGTGACAATCTGATCAAGGGTGAATAT AACGGCGGTAATTAATTTTCGCATTATCGATATGACCCCGAACGCTCTGAT TGGCTATGATGTCAATGTGGACAGTAAAGGTAATAACACGAAAGTGGCG CTGCTGATGGGCGTGGTGCCCATGTTAACGAAGAAGATATCGCCAAAT TCAAAAAACTGTCCCGCGAAAAAGGCATCCCGGAAGAAAACATCATTTA CCTGGGCGATAACCGATAACTGTCCGAACCACGAACATCACCACCATCAC CACTAA</p>
Can f 5	<p>ATGTGGTTTCTGGCACTGTGTCTGGCTATGTCGCTGGGCTGGACGGGTGC TGAACCGCATTTCCAACCGCGTATCATTGGTGGTTCGTGAATGCCTGAAAA ACTCACAGCCGTGGCAAGTGGCGGTTTATCATAATGGCGAATTTGCCTGT GGCGGTGTCCTGGTGAACCCGGAATGGGTGCTGACCGCGGCCATTGCG CGAACTCGAATTGTGAAGTTTGGCTGGGCGTCAACAATCTGAGCGAATC TGAAGATGAGGGTTCAGCTGGTTCAAGTCCGCAAAAGTTTCATTCACCCG CTGTACAAAACCAAGTCCCGCGTGCAGTTCGCTCCGGGTGAAGATC GTTCCCATGACCTGATGCTGCTGCACCTGGAAGAACCGGCAAAAATTAC CAAAGCTGTGCGCGTTATGGACCTGCCGAAAAAAGAACCAGCGCTGGGC AGTACGTGCTATGTCAGTGGCTGGGGTTCCACCGATCCGGAACGATCTT TCATCCGGGTTCACTGCAGTGCAGTTCGCTGAAACTGCTGTGCAACAATC AGTGTGCAAAAGTTTACACCCAAAAAGTACGAAATTCATGCTGTGCGC TGGCGTGTGGAAGGTAAAAAAGATACCTGCAAAGGCGACTCTGGCGGT CCGCTGATTTGTGATGGCGAACTGGTGGGTATCACCAGCTGGGGCGCGA CCCCGTGTGGTAAACCGCAGATGCCGTCTCTGTATACGCGTGTATGCCG CACCTGATGTGGATTAAAGACACGATGAAAGCAAACACGCACCACCACC ACCACCATTA</p>

Продолжение таблицы 8

1	2
Can f 6	ATGCACGAAGAAGAAAACGATGTGGTGAAAGGCAACTTTGACATCTCGA AAATCAGCGGTGACTGGTACTCTATCCTGCTGGCAAGCGACATTAAAGA AAAAATCGAAGAAGAAAACGGCAGTATGCGTGTCTTTGTGAAAGATATTGAA GTGCTGTCCAATAGCTCTCTGATCTTCACCATGCATACGAAAGTTAACGG TAAATGCACCAAAATTAGCCTGATCTGTAATAAAACGGAAAAAGATGGC GAATATGACGTGGTTCATGATGGTTACAACCTGTTTCGCATTATCGAAAC CGCGTATGAAGACTACATTATCTTTCACCTGAACAATGTGAATCAGGAA CAAGAATTTCACTGATGGAACGTATGGCCGTAAACCGGATGTTAGCC CGAAAGTCAAAGAAAAATTCGTCCGCTACTGCCAGGGTATGGAAATTCC GAAAGAAAACATCCTGGACCTGACGCAAGTTGATCGTTGTCTGCAGGCA CGTCAATCAGAAGCTGCACAGGTTTCGTCCGCCGAACACCACCACCATC ATCATTA

Таблица 9 – Аминокислотные последовательности аллергенов Can f 1 – Can f 6

Название	Аминокислотная последовательность
Can f 1	MQDTPALGKDTVAVSGKWYLKAMTADQEVPEKPDSVTPMILKAQKGGNL EAKITMLTNGQCQNITVVLHKTSEPGKYTAYEGQRVVFIIQSPVRDHYILYC EGELHGRQIRMAKLLGRDPEQSQEALDFWEFSRAKGLNQEILELAQSETC SPGGQHNNNNNN
Can f 2	MQEGNHEEPQGGLEELSGRWHSVALASNKSDLIKPWGHRVFIHMSAKD GNLHGDILIPQDGQCEKVSLEAFKATSNKFDLEYWGHNDLYLAEVDPKSY LILYMINQYNDTSLVAHLMVRDLRQQDFLPAFESVCEDIGLHKDQIVVL SDDDRCCQGSRDHNNNNNN
Can f 4	MQLPLPNVLTQVSGPWKTLYISSNNLDKIGDNGPFRIYMRGINVDIPRLKMS FNFYVKVDGECVENSVGASIGRDNLKGEYNGGNYFRIIDMTPNALIGYDV NVDSKGGKITKVALLMGRGAHVNEEDIAKFKKLSREKGIPEENIYLGDTDNC PNHEHNNNNNN
Can f 5	MIIGGRECLKNSQPWQVAVYHNGEFACGGVLVNPWVLTAAHCANSNCE VWLGRHNLSESEDEGQLVQVRKSFHPLYKTKVPRAVIRPGEDRSHDLMLL HLEEPAKITKAVRVMDLPKKEPPLGSTCYVSGWGSTDPEIFHPGSLQCVDL KLLSNNQCAKVYTQKVTKFMLCAGVLEGKKDTCKGDSGGPLICDGELVGI TSWGATPCGKQPMPPLYTRVMPHLMWIKDTMKANNNNNNN
Can f 6	MHEEENDVVKGNFDISKISGDWYSILLASDIKEKIEENGSMRVFVKDIEVLS NSSLIFTMHTKVNGKCTKISLICNKTEKDGEYDVVHDGYNLFRIIETAYEDY IIFHLNNVNQEQEFQLMELYGRKPDVSPKVKEKFVRYCQGMIEIPKENILDLT QVDRCLQARQSEAAQVSSAEHNNNNNN

Синтетический ген Can f 1 был успешно клонирован в экспрессионный вектор pET17b. В результате трансформации клеток штамма *E. coli* BL21 Gold (DE3) был получен штамм-продуцент *E. coli* BL21 Gold/pETF1.

Синтетический ген Can f 2 был клонирован в экспрессионный вектор pET22b. При трансформации клеток штамма *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) был получен штамм-продуцент *E. coli* Rosetta-Gami B/pETF2.

Синтетические гены Can f 4 и Can f 6 были клонированы в экспрессионный вектор pET27b. Трансформация клеток штамма *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) привела к получению штаммов-продуцентов *E. coli* BL21 Gold/pETF4 и *E. coli* BL21 Gold/pETF6 соответственно.

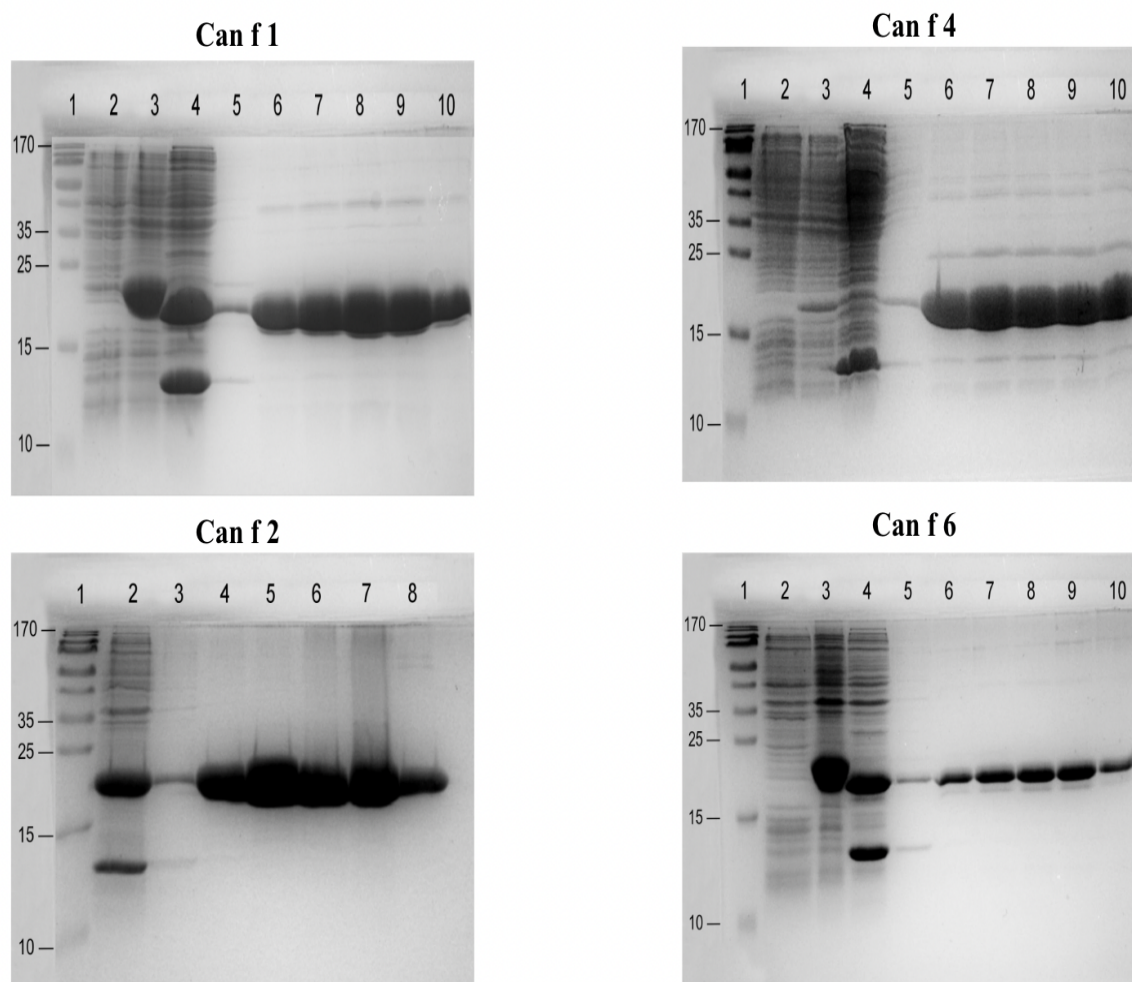
Кроме того, синтетический ген Can f 5 был клонирован в экспрессионный вектор pET27b. В ходе трансформации клеток штамма *E. coli* BL21 Gold (DE3) был получен штамм-продуцент *E. coli* BL21 Gold/pETF5.

Таким образом, были получены штаммы-продуценты, обеспечивающие экспрессию рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6, что создало основу для дальнейшего исследования их свойств и функциональной активности.

3.2. Получение и характеристика рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4 и Can f 6

Трансформированные штаммы-продуценты *E. coli* BL-21Gold/pETF1, Rosetta-Gami B/pETF2, BL-21Gold/pETF4 и BL-21Gold/pETF6 высевались на агаризованных чашках Петри, содержащих селектирующие антибиотики ампициллин или канамицин, и инкубировались в течение ночи при температуре 37°C. Индукцию синтеза целевого белка проводили путём добавления индуктора IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Хроматографическую очистку проводили согласно протоколу компании QIAGEN для выделения белков в растворимой форме, используя технологию, подробно описанную в разделе «Материалы и методы исследования». Качество полученных фракций контролировалось методом

ПААГ-электрофореза (рисунок 9). Затем фракции объединяли и подвергли диализу в окончательном буфере для хранения.



Примечание: Для аллергенов Can f 1, Can f 4 и Can f 6 приведены следующие обозначения: 1 – маркер молекулярной массы (кДа); 2 – фракция до индукции; 3 – фракция после индукции; 4 – фракция проскока; 5 – фракция отмывки; 6 - 10 – фракции элюатов. Для аллергена Can f 2 приведены следующие обозначения: 1 – маркер молекулярной массы (кДа); 2 – фракция проскока; 3 – фракция отмывки; 4 - 8 – фракции элюатов

Рисунок 9 – ПААГ электрофорез фракций рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 6

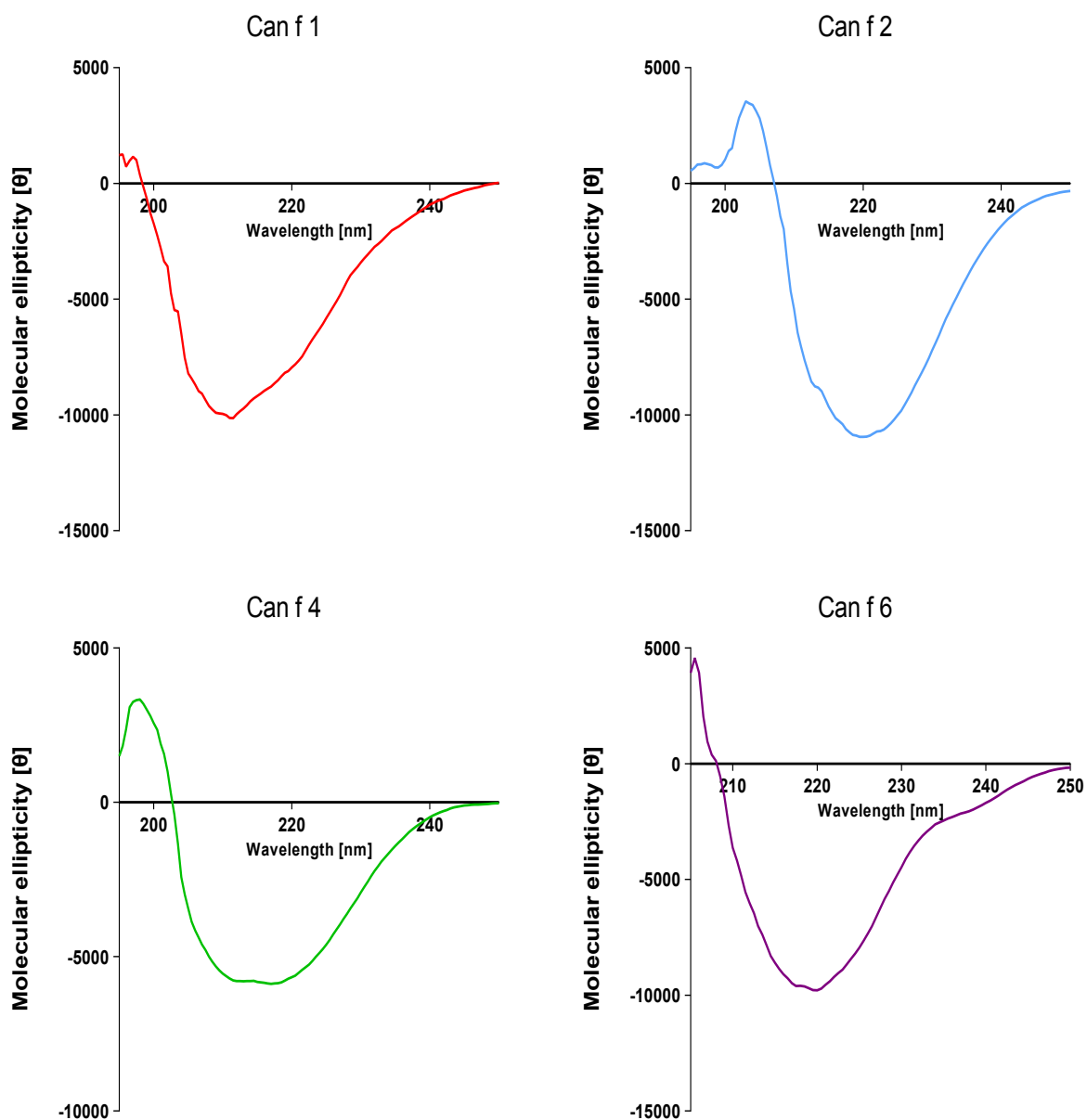
Для анализа вторичной структуры рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4 и Can f 6 был применён метод спектроскопии кругового дихроизма. Исследование проводилось на спектрополяриметре в УФ-области спектра (200 – 240 нм) с разрешением 0,5 нм и скоростью сканирования 50 нм/мин. Данный метод позволяет оценить процентное соотношение α -спиралей, β -листов и гибких участков белковой цепи, которые не формируют регулярных вторичных структур.

Анализ спектров выполнялся с использованием алгоритмов CONTINLL и CDSSTR на платформе DICROWEB (рисунок 10).

Аллерген Can f 1, принадлежащий к семейству липокалинов, демонстрирует следующие параметры вторичной структуры: 5,2% α -спиралей, 40,7% β -листов, 21,7% β -изгибов и 32,4% неупорядоченных участков. Такая структура соответствует типичной для липокалинов преобладания β -складчатых элементов при низком содержании α -спиралей (рисунок 10). Согласно работе Curin et al., Can f 1 содержит преимущественно конформационные эпитопы. Основные области связывания IgE-антител находятся на N- и C-концах молекулы, причём C-концевая область в районе остатка Arg152 играет ключевую роль в связывании IgE [26].

Анализ вторичной структуры Can f 2 показал: 15,7% α -спиралей, 39,0% β -листов, 18,2% β -изгибов и 26,0% неупорядоченных участков. Madhurantakam et al. представили кристаллическую структуру Can f 2, демонстрирующую классическую липокалиновую складку с консервативным мотивом Gly-Xaa-Trp, где остаток Trp19 стабилизирует топологию мономера [30]. Can f 2 проявляет перекрестную реактивность с аллергеном кошки Fel d 4, несмотря на менее чем 22% идентичность последовательностей [9,67]. Это объясняется наличием сходных участков (94 – 104, 122 – 132, 134 – 141) с аналогичным распределением зарядов.

Для аллергена Can f 4 было характерно: 10,5% α -спиралей, 31,7% β -листов, 20,9% β -изгибов и 36,9% неупорядоченных участков. Merja H. Niemi et al., показали, что Can f 4 способен образовывать транзистентные димеры [86]. Несмотря на принадлежность к одному семейству с Can f 2, Can f 4 демонстрирует значительные различия в структуре, механизмах димеризации и лиганд-связывающих свойствах. Способность Can f 4 образовывать слабые димеры может усиливать его аллергенность, тогда как Can f 2 преимущественно существует в мономерной форме.



Примечание: Средние значения эллиптичности аминокислотных остатков (Θ) для отдельных рекомбинантных аллергенов собак показаны на оси ординат. Значения длин волн (нм) указано на оси абсцисс.

Рисунок 10 – Спектроскопия кругового дихроизма аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 6

Анализ спектров кругового дихроизма для Can f 6 выявил характерную для липокалинов смешанную вторичную структуру с преобладанием β -листов (~37,5%) и высоким содержанием неупорядоченных участков (~35 – 36%). α -спирали составляют около 3%, что подчёркивает их минимальную роль в формировании структуры белка. Высокое содержание β -поворотов (около 24%) связано с образованием петель, соединяющих β -слои. Известно, что Can f 6, Fel d 4 и Equ c 1

обладают перекрёстной IgE-реактивностью благодаря общим эпитопам. Исследования Kenji Yamamoto et al. и Christiane Hilger et al. продемонстрировали высокое структурное сходство и консервативность аминокислотных последовательностей этих аллергенов [29,45]. Были идентифицированы три потенциальных IgE-связывающих сайта, которые, вероятно, участвуют в перекрёстной реактивности.

Для подтверждения молекулярных масс полученных рекомбинантных аллергенов использовали метод масс-спектрометрического анализа. В таблице 10 представлены теоретически рассчитанные молекулярные массы аллергенов на основе первичной структуры белка, а также экспериментально полученный молекулярный вес по данным времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF). Теоретически рассчитанные молекулярные массы всех аллергенов соответствовали экспериментальным данным (рисунки 11 – 14).

Таблица 10 – Молекулярная масса (Да) и белков Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Can f 6

Название аллергена	Теоретический молекулярный вес (кДа)	Экспериментальный молекулярный вес (кДа)
Can f 1	18,303	18,537
Can f 2	19,331	19,513
Can f 4	18,576	18,753
Can f 6	21,146	21,377

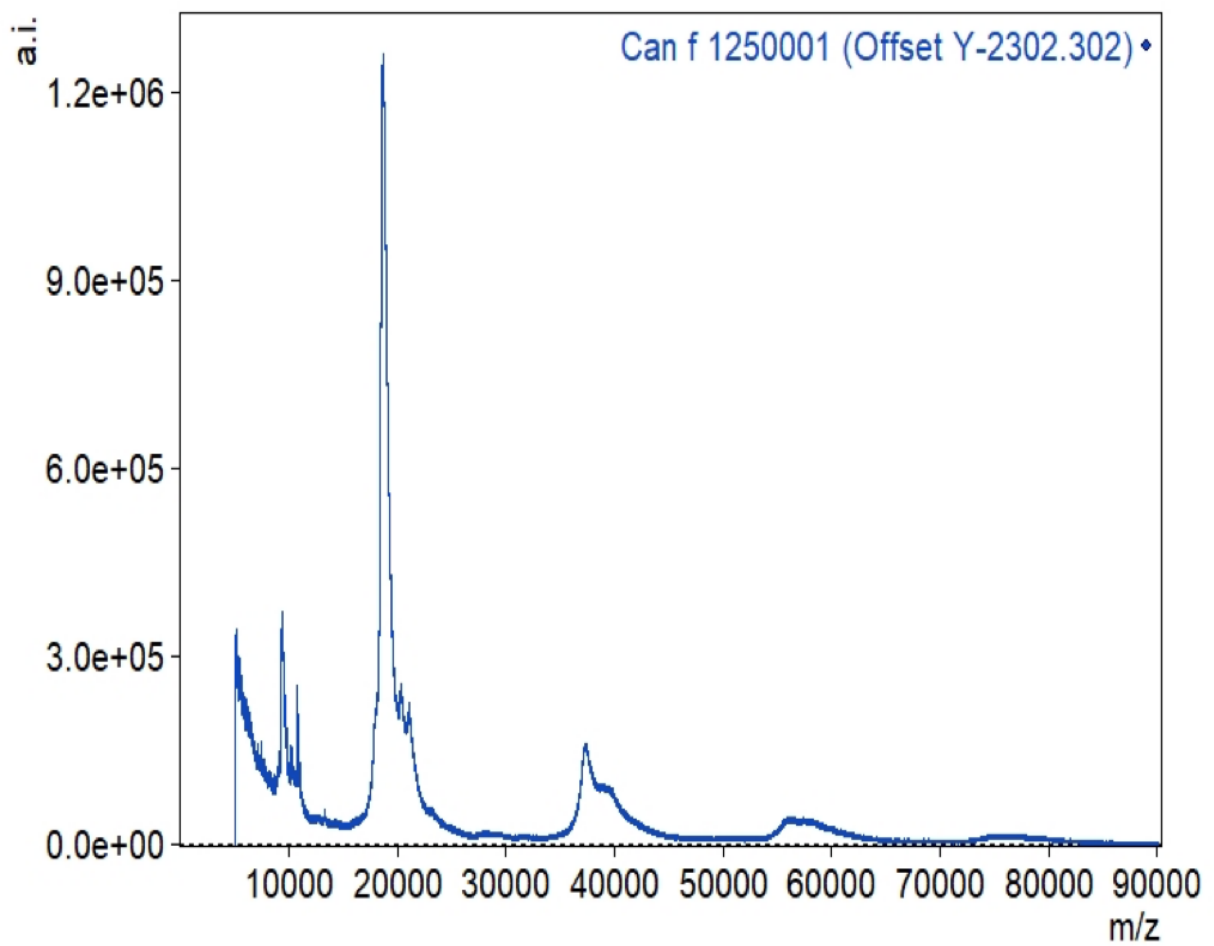


Рисунок 11 – Масс-спектрометрический анализ аллергена Can f 1. Целевой пик соответствует молекулярной массе 18,537 кДа

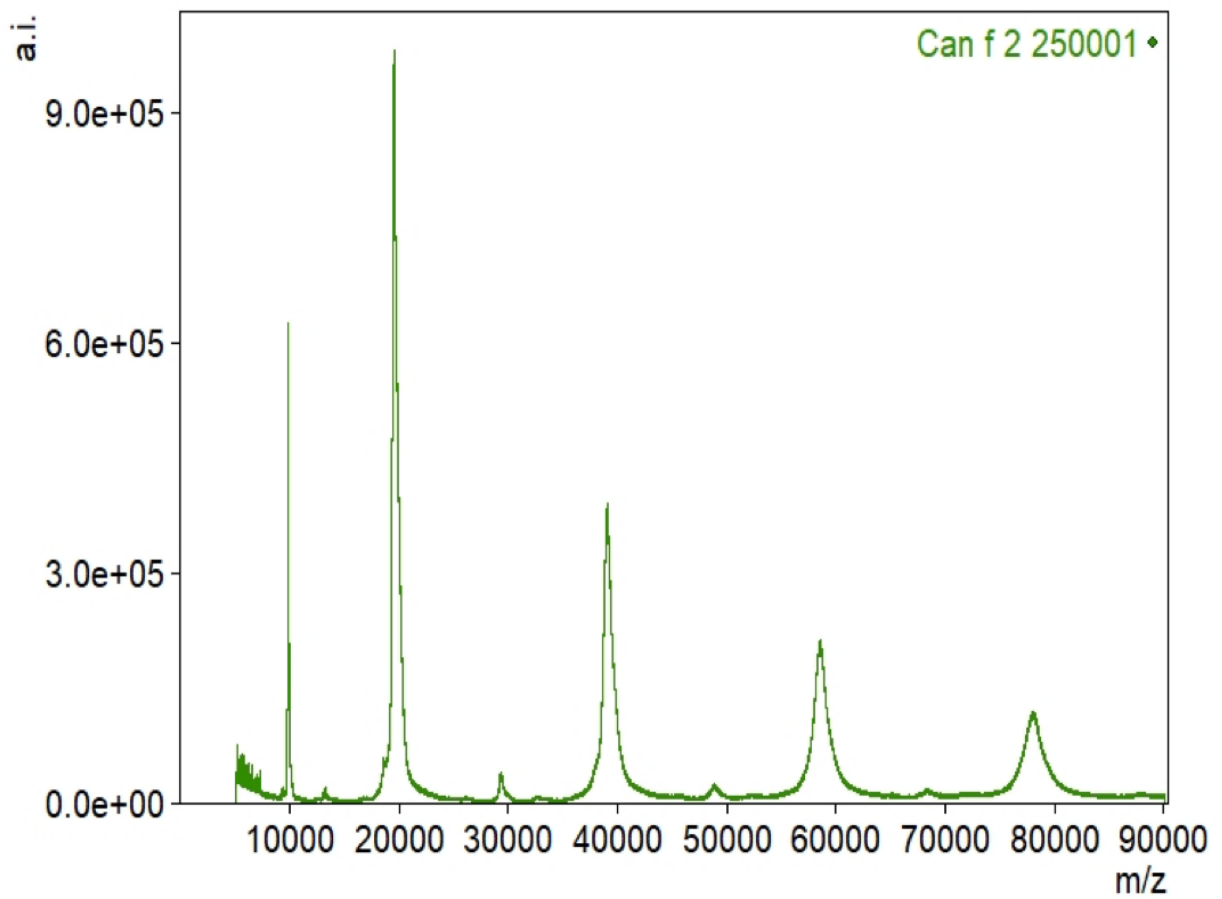


Рисунок 12 – Масс-спектрометрический анализ аллергена Can f 2. Целевой пик соответствует молекулярной массе 19,513 кДа

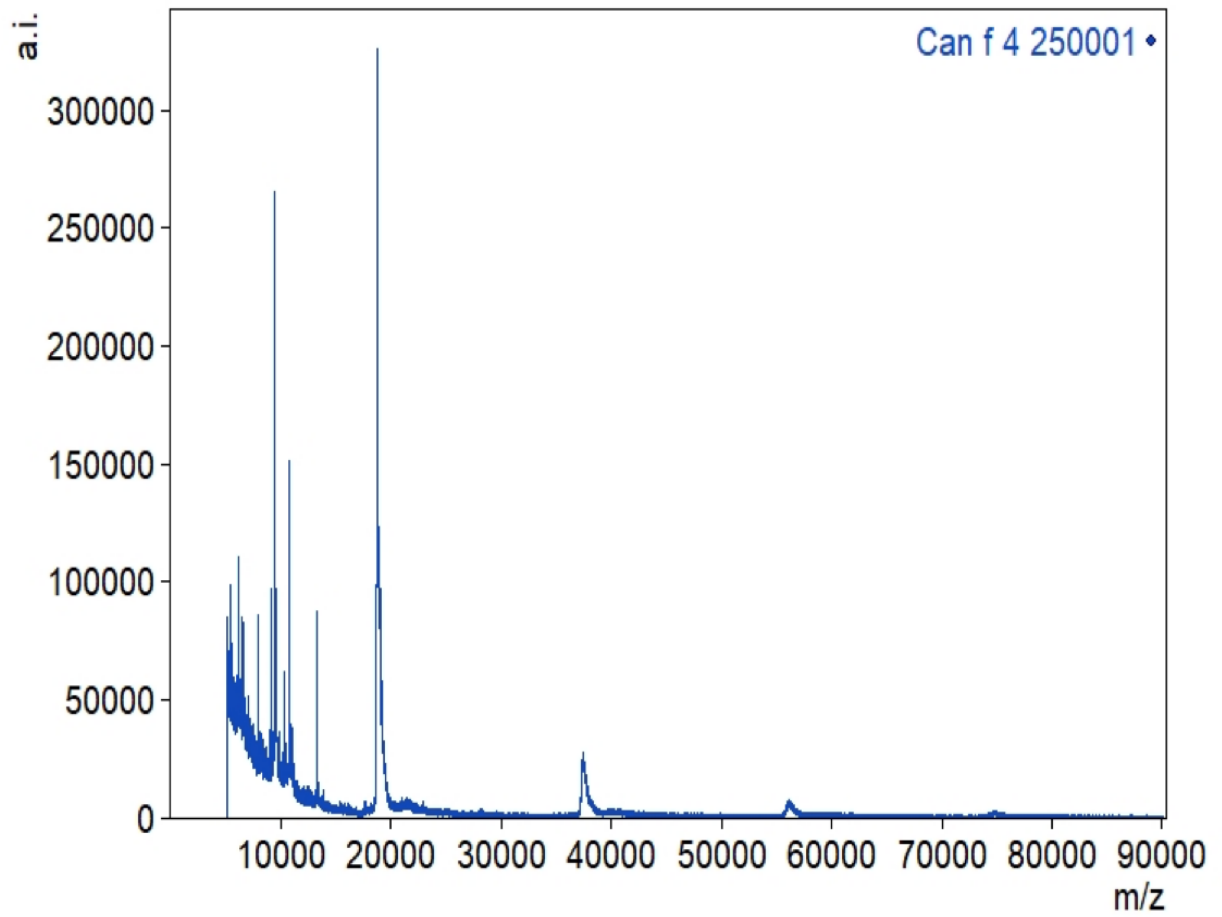


Рисунок 13 – Масс-спектрометрический анализ аллергена Can f 4. Целевой пик соответствует молекулярной массе 18,753 кДа

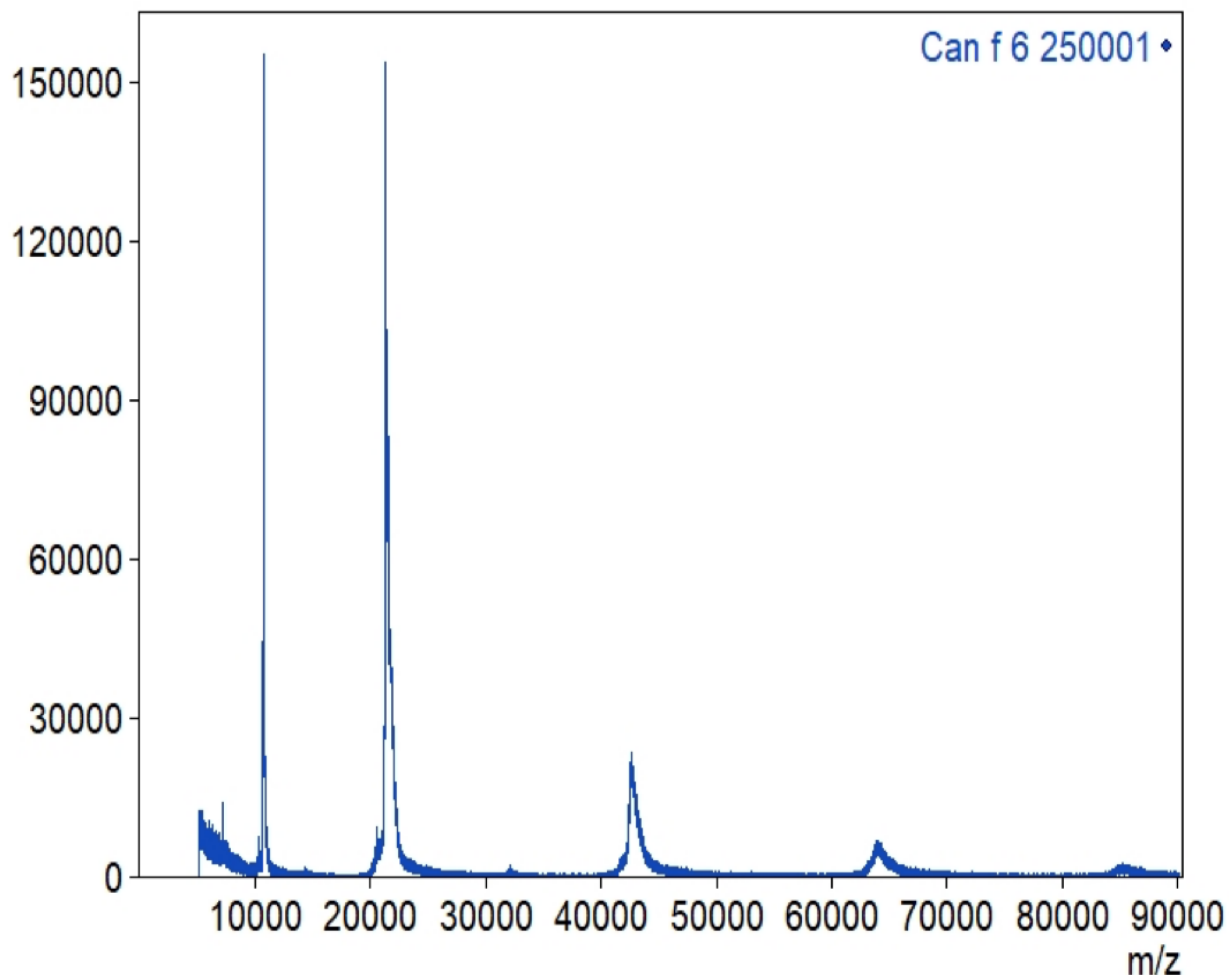
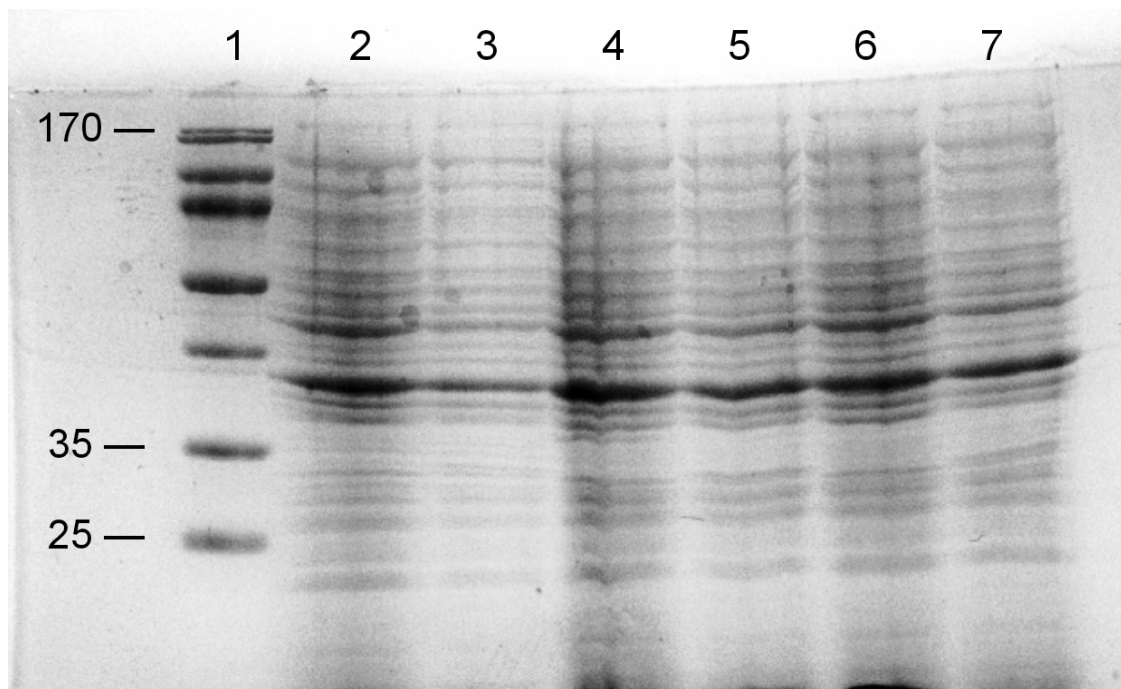


Рисунок 14 – Масс-спектрометрический анализ аллергена Can f 6. Целевой пик соответствует молекулярной массе 21,377 кДа

3.3. Разработка, получение и характеристика рекомбинантного Can f 5

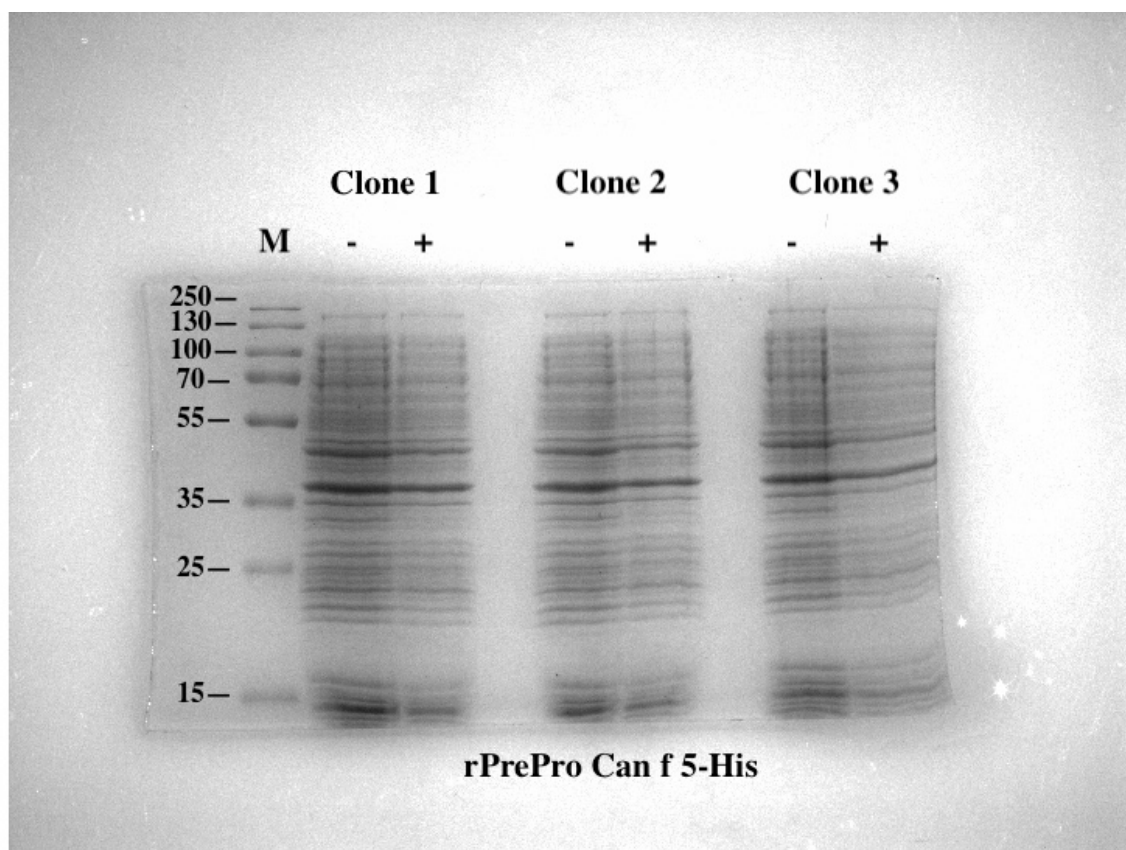
Трансформированный штамм-продуцент *E. coli* BL-21Gold/pETF5 высевался на агаризованную чашку Петри, содержащая селективирующий антибиотик канамицин и инкубировали в течение ночи при температуре 37°C (PrePro Can f 5-His). Индукцию синтеза целевого белка проводили путём добавления индуктора IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Было показано отсутствие индукции синтеза целевого продукта в штамме BL-21Gold/pETF5 (рисунок 15).



Примечание: На фиг. 3 цифрами обозначены следующие фракции: маркер молекулярной массы – 1; фракция до индукции клон 1 – 2; фракция после индукции клон 1 – 3; фракция до индукции клон 2 – 4; фракция после индукции клон 2 – 5; фракция до индукции клон 3 – 6; фракция после индукции клон 3 – 7

Рисунок 15 – Результаты электрофореза в полиакриламидном геле клеточных лизатов BL-21 Gold (DE3), содержащих фракции белков Can f 5 с нативной последовательностью, окрашенные раствором Кумасси

Для оценки возможности индукции синтеза последовательности Can f 5 дикого типа (Y00751.1) в штамме *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) канамицин устойчивую матрицу pET27b переклонировали в ампициллин устойчивый вектор pET22b по сайтам рестрикции *NdeI* - *EcoRI*. Аналитическая экспрессия в штамме *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3) также не приводила к экспрессии целевого продукта (рисунок 16).



Примечание: Показаны лизаты до индукции (дорожки -) и после индукции (дорожки +)

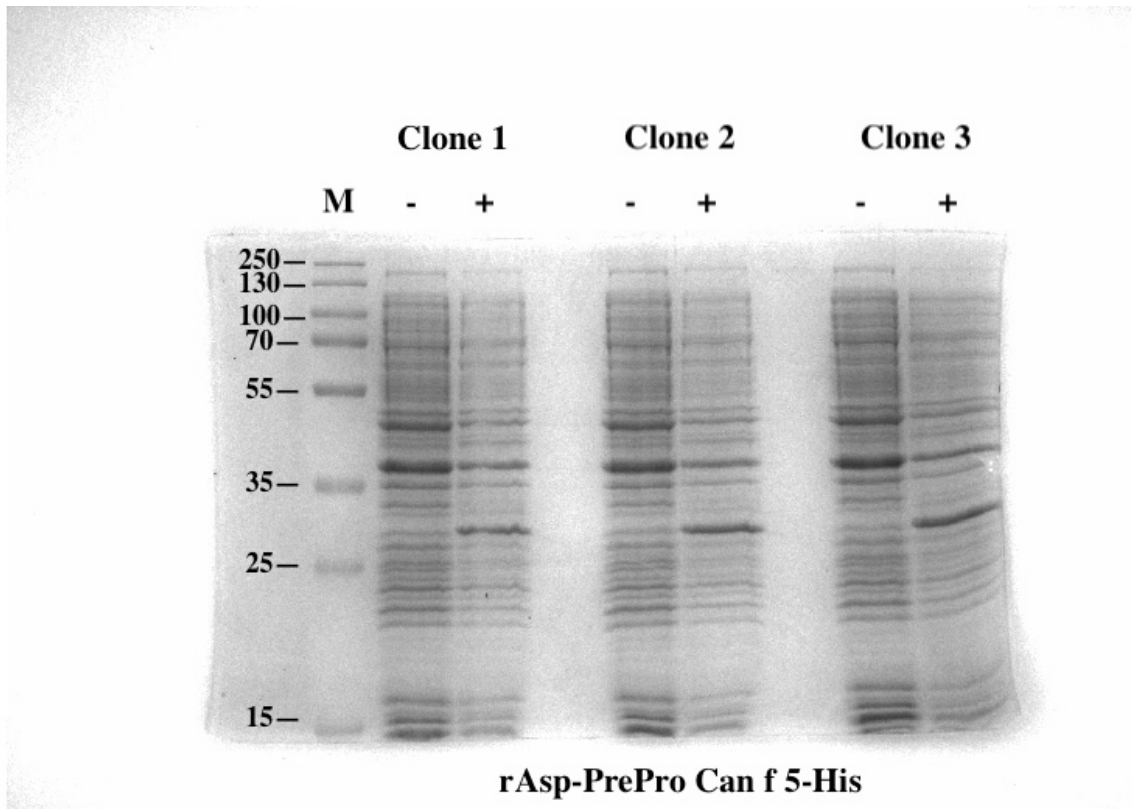
Рисунок 16 – Результаты электрофореза в полиакриламидном геле клеточных лизатов Rosetta-Gami B (DE3), который содержит маркер молекулярной массы (M, кДа) и лизаты из клеточной культуры трех клонов трансформированных плазмидной конструкцией rPrePro Can f 5-His

Известно, что дикий тип Can f 5 содержит сигнальный пептид (1-17), пропептид (18-24) и основную полипептидную цепь (25-260) (таблица 11).

Таблица 11 – Анализ Аминокислотной последовательности Can f 5

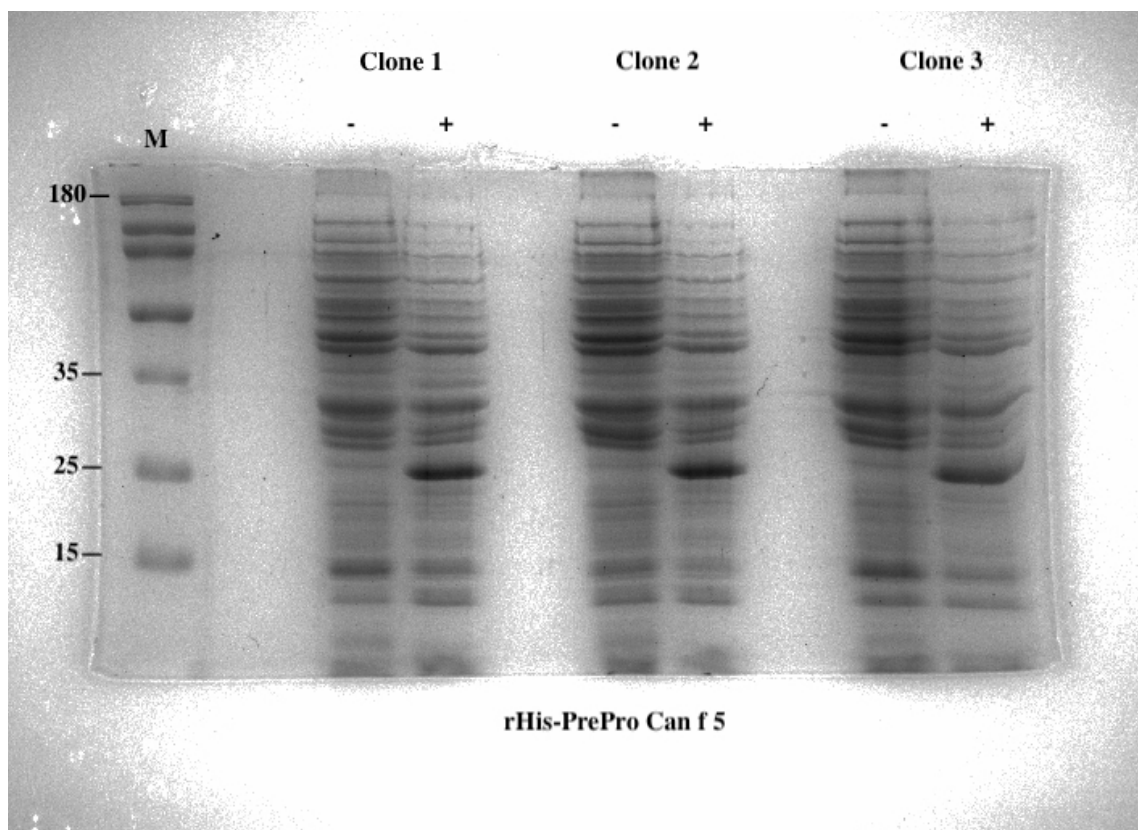
<p>Аминокислотная последовательность предшественника Can f 5 (1-260 а.м)</p>	<p>MWFLALCLAMSLGWTGAEPHFQPRIIGGREG LKNSQPWQVAVYHNGEFACGGVLVNPEWVL TAAHCANSNCEVWLGRHNLSESEDEGQLVQV RKSFIHPLYKTKVPRAVIRPGEDRSHDLMLLH LEEPAKITKAVRVM DLPKKEPPLGSTCYVSG WGSTD PETIFHPGSLQCVDL KLLSNNQCAKVY TQKVTKFMLCAGVLEGKKDTCKGDSGGPLIC DGELVGITSWGATPCGKPQMPSLYTRVMPHL MWIKDTMKANT</p>
<p>Аминокислотная последовательность сигнального пептида (1-17 а.о)</p>	<p>MWFLALCLAMSLGWTGA</p>
<p>Аминокислотная последовательность пропептида (18-24 а.о)</p>	<p>EPHFQPR</p>
<p>Аминокислотная последовательность зрелого белка (25-260 а.о)</p>	<p>IIGGRECLKNSQPWQVAVYHNGEFACGGVLV NPEWVL TAAHCANSNCEVWLGRHNLSESEDE GQLVQVRKSFIHPLYKTKVPRAVIRPGEDRSH DLMLLHLEEPAKITKAVRVM DLPKKEPPLGST CYVSGWGSTD PETIFHPGSLQCVDL KLLSNNQ CAKVYTQKVTKFMLCAGVLEGKKDTCKGDS GGPLICDGELVGITSWGATPCGKPQMPSLYTR VMPHLMWIKDTMKANT</p>

Было предположено, что данная конфигурация конструкции Can f 5 препятствует эффективной инициации трансляции белка. Для решения данной проблемы предложено добавление гидрофильной аминокислоты аспарагина к N-концу белка (rAsp-PrePro Can f 5-His), замена C-терминальной гексагистициной метки на N-конец (rHis-PrePro Can f 5-His) и удаление лидерного пептида из конструкции Can f 5 (Pro Can f 5-His). На рисунках 17 – 19 представлен ПААГ-электрофорез полученных конструкций. Было продемонстрировано, что все модификации приводят к эффективной инициации трансляции и синтезу рекомбинантного Can f 5.



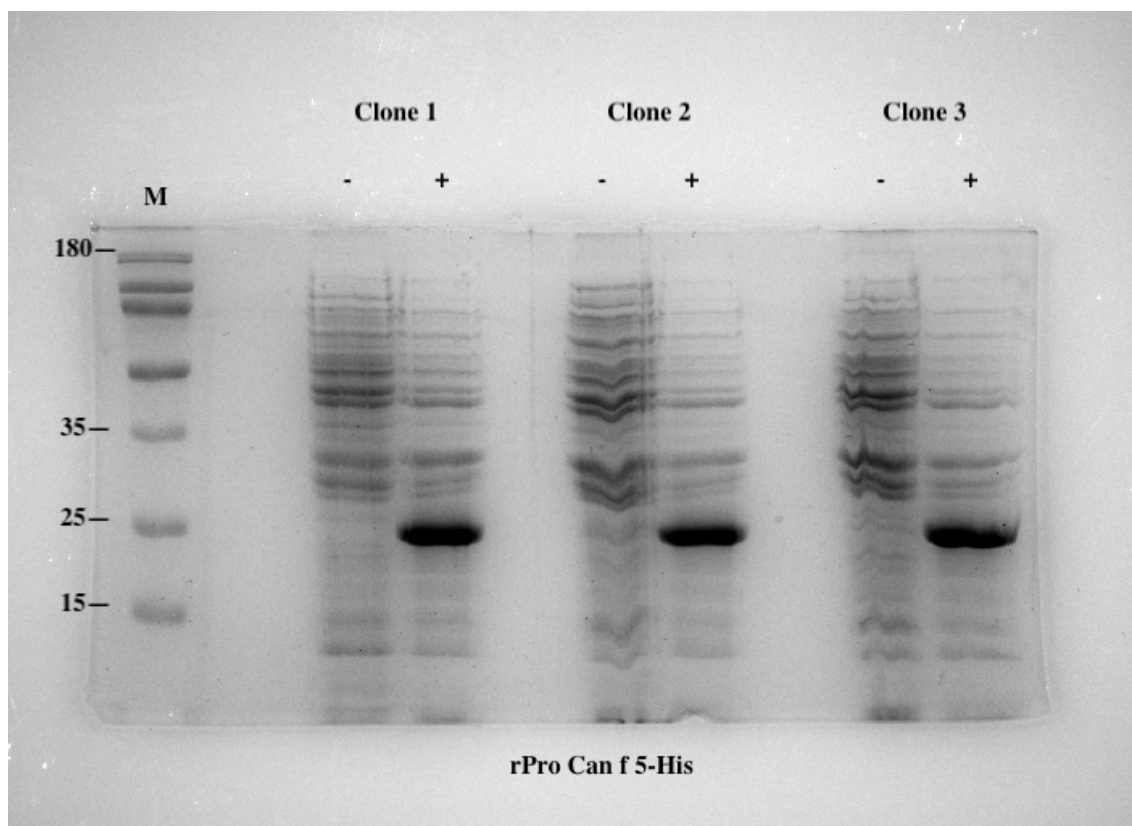
Примечание: Показаны лизаты до индукции (дорожки -) и после индукции (дорожки +)

Рисунок 17 – Результаты электрофореза в полиакриламидном геле клеточных лизатов Rosetta-Gami B (DE3), который содержит маркер молекулярной массы (M, кДа) и лизаты из клеточной культуры трех клонов трансформированных плазмидной конструкцией rASP-PrePro Can f 5-His



Примечание: Показаны лизаты до индукции (дорожки -) и после индукции (дорожки +)

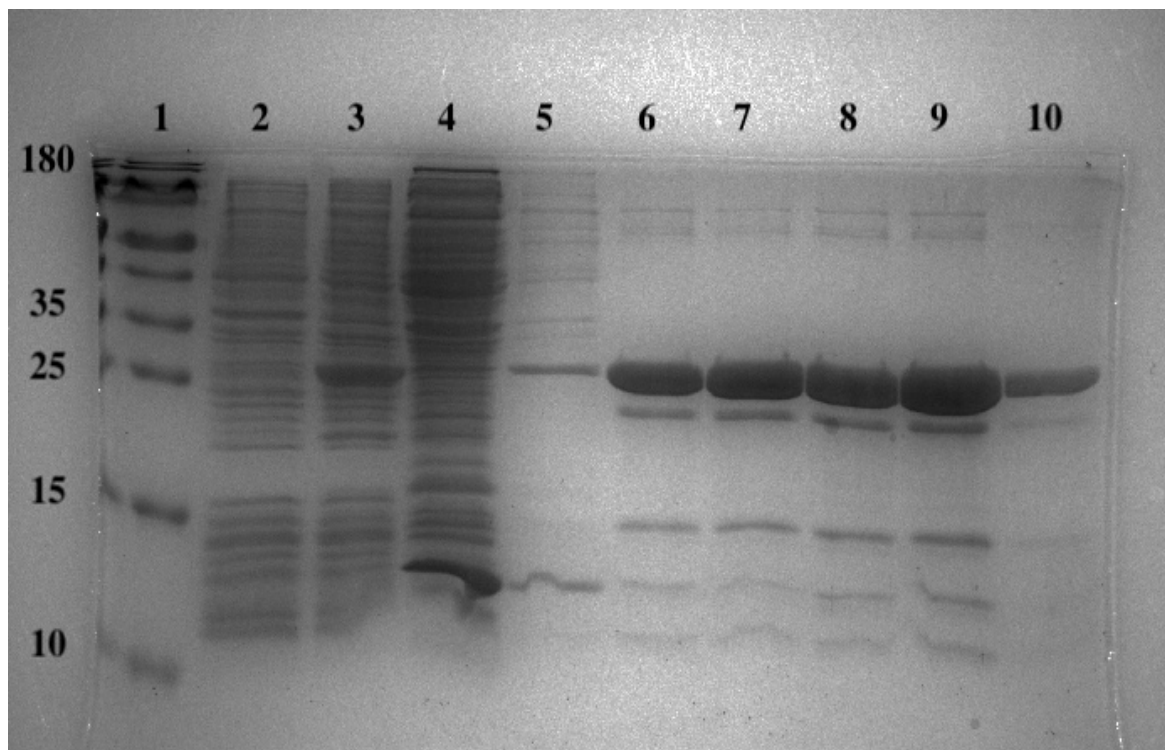
Рисунок 18 – Результаты электрофореза в полиакриламидном геле клеточных лизатов Rosetta-Gami B (DE3), который содержит маркер молекулярной массы (M, кДа) и лизаты из клеточной культуры трех клонов трансформированных плазмидной конструкцией rHis-PrePro Can f 5-His



Примечание: Показаны лизаты до индукции (дорожки -) и после индукции (дорожки +)

Рисунок 19 – Результаты электрофореза в полиакриламидном геле клеточных лизатов Rosetta-Gami B (DE3), который содержит маркер молекулярной массы (М, кДа) и лизаты из клеточной культуры трех клонов трансформированных плазмидной конструкцией rPro Can f 5-His

Для финальной экспрессии Can f 5 была выбрана конструкция без лидерного пептида ввиду того, что целевой продукт нарабатывался главным образом в растворимой фракции, не требуя рефолдинга, что облегчает последующую очистку. При трансформации клеток штамма *E. coli* Shuffle T7 был получен штамм-продуцент *E. coli* Shuffle T7/pETF5. Очистка целевого продукта была выполнена методом аффинной хроматографии по протоколу QIAGEN для белков получаемых в растворимой фракции (рисунок 20).



Примечание: Цифрами обозначены следующие дорожки: 1 – маркер молекулярной массы (кДа); 2 – фракция до индукции; 3 – фракция после индукции; 4 – фракция проскока; 5 – фракция отмывки; 6 - 10 – фракции элюатов

Рисунок 20 – ПААГ электрофорез фракций рекомбинантного аллергена Can f 5
Примечание.

Для подтверждения молекулярной массы рекомбинантного Can f 5 использовали метод масс-спектрометрического анализа. Целевой пик соответствовал 28089,39 Да, что совпадает с теоретически предсказанной молекулярной массой (рисунок 21).

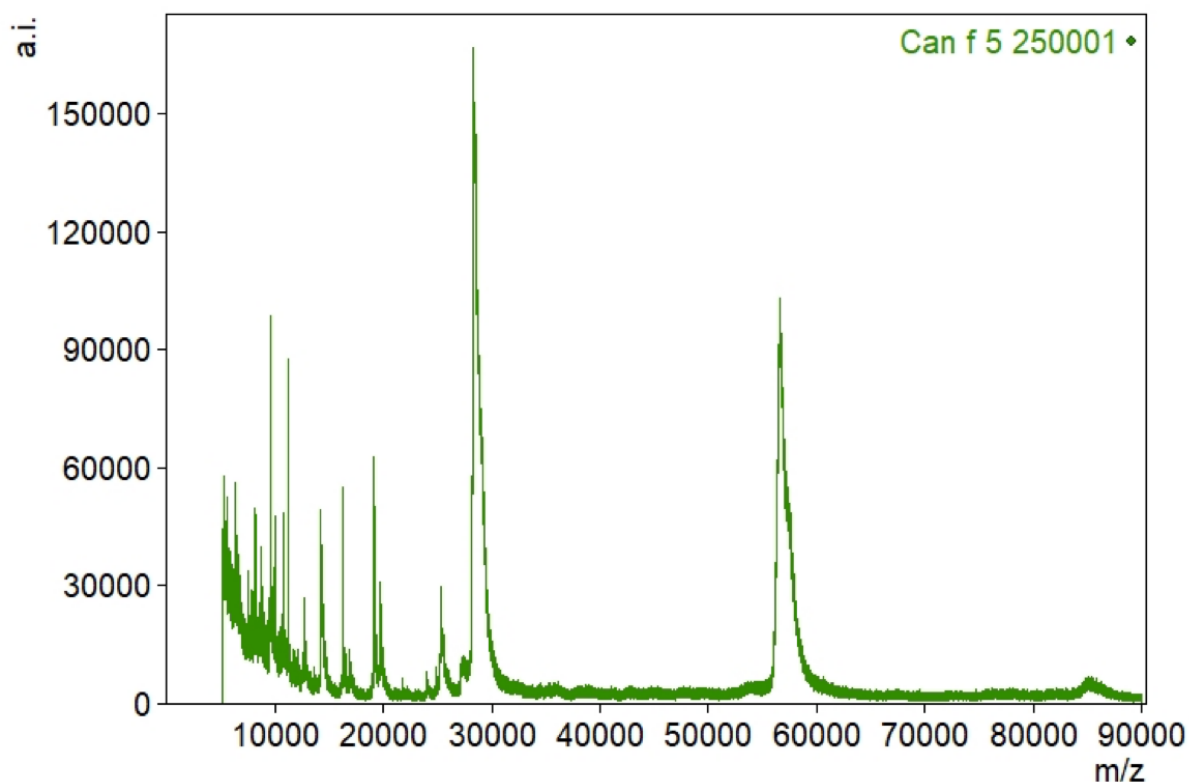


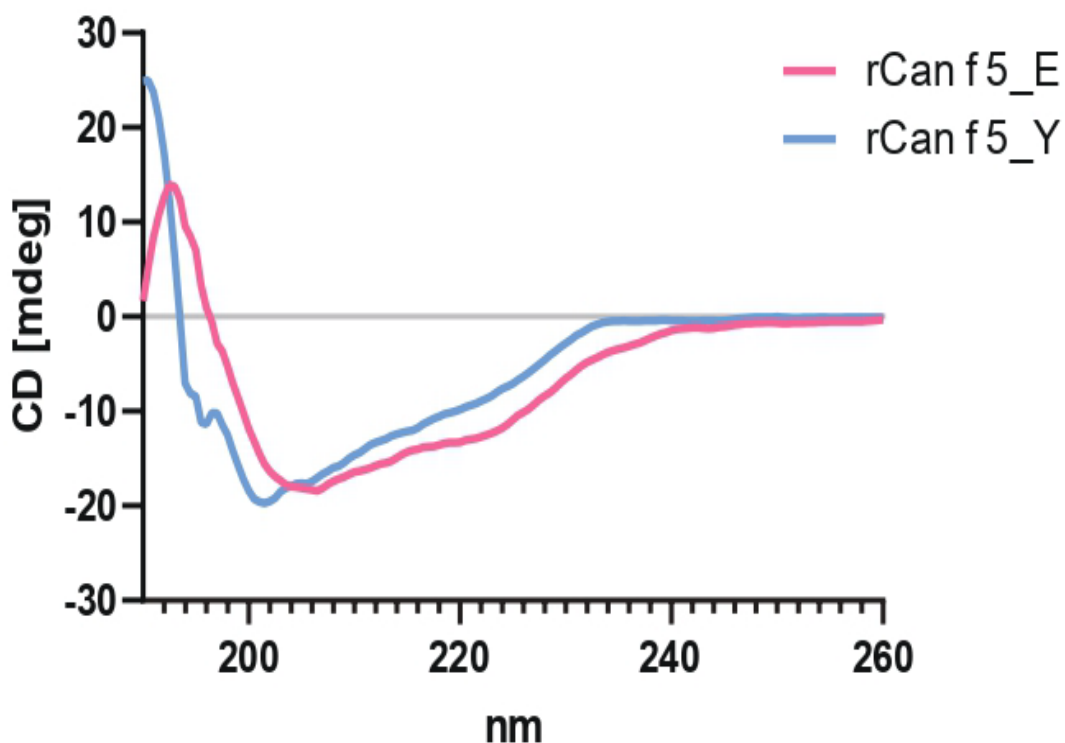
Рисунок 21 – Масс-спектрометрический анализ аллергена Can f 5. Целевой пик соответствует молекулярной массе 28089.39 Да

Анализ спектров кругового дихроизма показал, что рекомбинантный белок Can f 5 обладает высокоупорядоченной структурой с преобладанием α -спиралей (74,7%). Белок также содержит умеренную долю β -структур (15,8%) и небольшую долю β -поворотов (9,6%), что указывает на наличие как жёстких, так и гибких участков молекулы. Полное отсутствие неупорядоченных участков (0,0%) подтверждает стабильность и жёсткость пространственной структуры данного аллергена.

На данный момент данных о кристаллической структуре Can f 5 в литературе не представлено. Для более детальной характеристики был проведён сравнительный анализ спектров кругового дихроизма между рекомбинантным Can f 5, полученным в клетках *E. coli*, и коммерческим образцом Can f 5 (Rekom Biotech) (рисунок 22).

Результаты анализа показали, что вторичная структура коммерческого Can f 5 отличается преобладанием β -структур (53,3%) и умеренным содержанием α -спиралей (46,7%). При этом у коммерческого образца полностью отсутствуют β -повороты и неупорядоченные участки.

Таким образом, оба образца Can f 5 демонстрируют высокую степень упорядоченности структуры и отсутствие неупорядоченных участков [75]. Однако различия в соотношении α -спиралей и β -структур могут свидетельствовать о вариациях в пространственной укладке, что, возможно, связано с различиями в методах получения белков или посттрансляционных модификациях.



Примечание: На оси ординат показаны значения эллиптичности в миллиградусах (mdeg). Значения длин волн (нм) указано на оси абсцисс

Рисунок 22 – Сравнение спектров кругового дихроизма между рекомбинантным Can f 5 полученным в клетках *E. coli* (rCan f 5_E) и коммерческим рекомбинантным Can f 5 (rCan f 5_Y)

Для анализа связывания аллергенспецифических IgE-антител к вариантам рекомбинантного Can f 5 (rPrePro Can f 5-His, rAsp-PrePro Can f 5-His, rHis-PrePro Can f 5 и rPro Can f 5-His), продуцируемого в штаммах *E. coli* Rosetta-gami B (DE3), использовали метод вестерн-блоттинга. Было показано, что все варианты рекомбинантного Can f 5 связывали аллерген-специфические антитела пациентов с аллергией на собаку, что подтверждает функциональную активность полученного аллергена в качестве диагностического теста (рисунок 23).

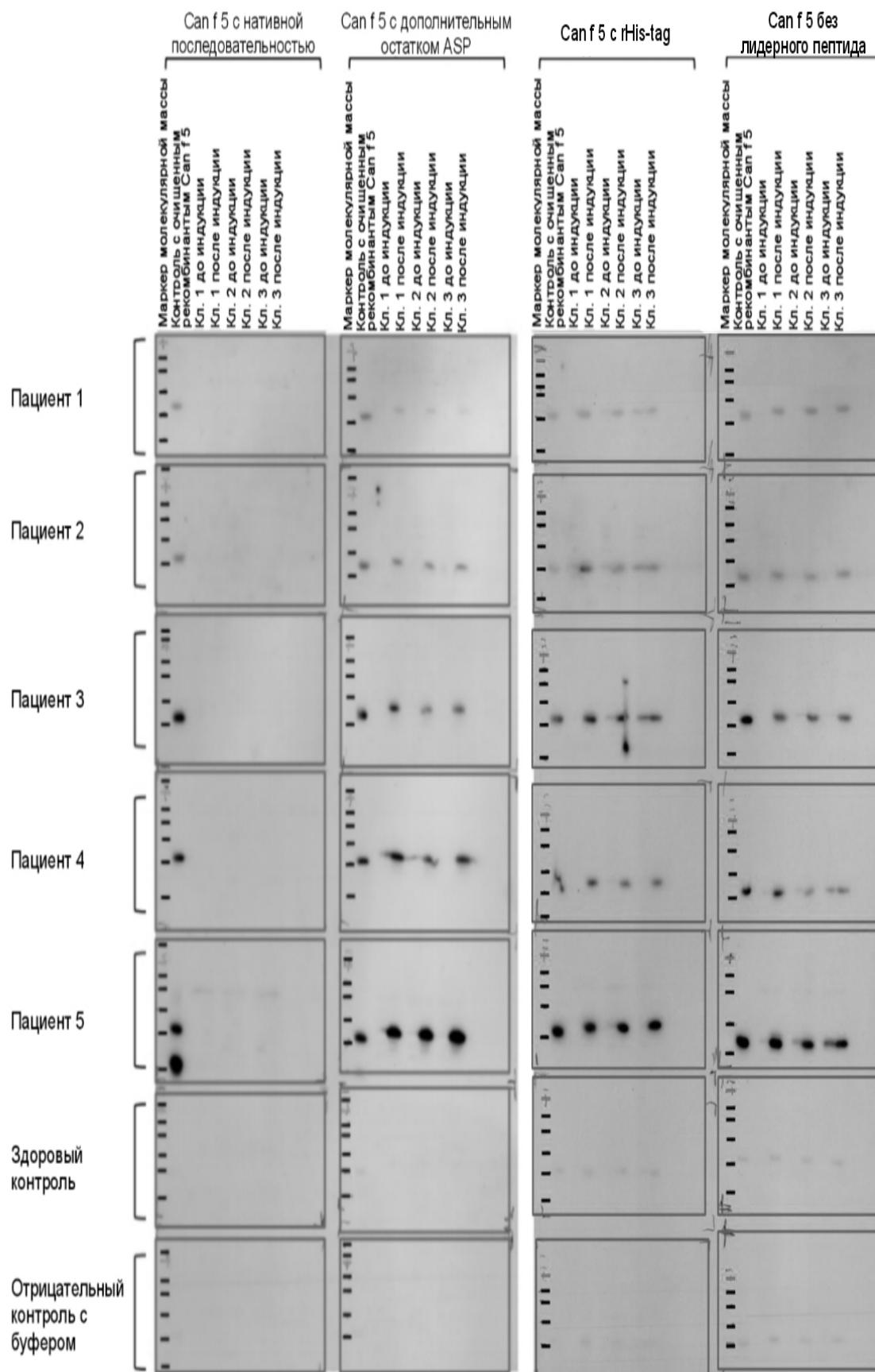


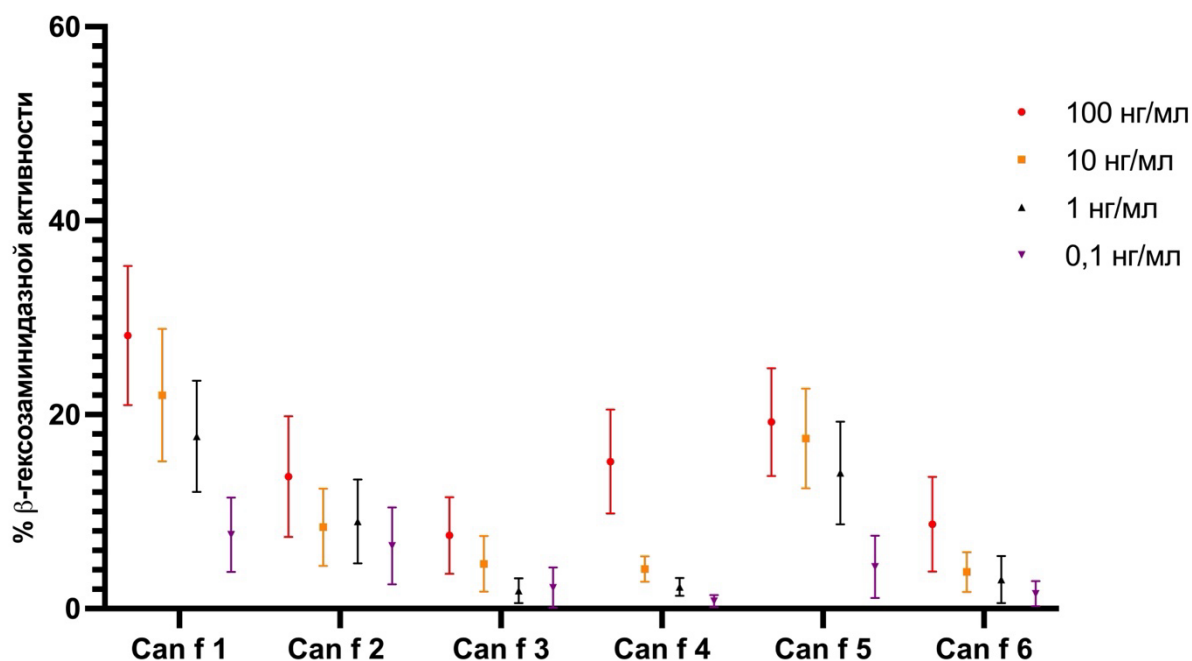
Рисунок 23 – Представлены результаты оценки реактивности аллерген-специфических IgE-антител человека с аллергией на собаку с помощью Вестерн-блоттинга

3.4. Анализ дегрануляции базофилов аллергенов Can f 1 - Can f 6

Клетки крысиного базофильного лейкоза (RBL), экспрессирующие высокоаффинный FcεRI рецептор, способны связывать сывороточные IgE пациентов с аллергией на собаку, что позволяет использовать этот метод для оценки аллергенной активности в контролируемых и воспроизводимых условиях. Для подтверждения физиологических свойств аллергенов Can f 1 – Can f 6 была проведена оценка их аллергенной активности с помощью метода дегрануляции базофилов (таблица 12). Для активации базофилов использовалась сыворотка 16 пациентов с подтвержденной сенсibilизацией на собаку. В качестве контроля использовали сыворотки здоровых пациентов и пациентов без аллергии на собаку, что было дополнительно подтверждено аллергологическими тестами. Базофилы, активированные сывороткой пациентов, инкубировали с рекомбинантными аллергенами собак в различных концентрациях (0,1 нг/мл, 1 нг/мл, 10 нг/мл и 100 нг/мл) для определения дозозависимой активации базофилов к индивидуальным аллергенам. Активация базофилов и их дегрануляция через FcεRI рецептор зависят от концентрации аллергена. Процесс дегрануляции базофилов описывается колоколообразной кривой, которая делится на три фазы: 1) восходящая эффекторная фаза, при которой дегрануляция усиливается с ростом концентрации аллергена; 2) фаза плато; 3) нисходящая фаза, когда дегрануляция снижается с увеличением концентрации аллергена. Достижение порогового значения дегрануляции при определенной концентрации аллергена и последующее снижение дегрануляции при дальнейшем увеличении концентрации аллергена представляют собой защитный механизм, который помогает уменьшить проявление аллергических симптомов.

Таблица 12 – Сводные результаты дегрануляции базофилов тучных клеток для аллергокомпонентов Can f 1 – Can f 6

Аллерген	Пациент	Плато дегрануляции	Минимальная концентрация, нг/мл
	Позитивные пациенты, N (%)	Диапазон, нг/мл	
Can f 1	11/16 (68,75%)	10-100	10
Can f 2	6/16 (37,5%)	0,1-100	1
Can f 3	3/16 (18,75%)	1-100	1
Can f 4	8/16 (50%)	10-100	10
Can f 5	8/13 (61,5%)	10-100	10
Can f 6	4/16 (25%)	0,1-100	0,1



Примечание: По шкале абсцисс отложен % β -гексозаминидазной активности после стимуляции базофилов. По шкале ординат отложены концентрации аллергенов (0,1 – 100 нг/мл), соответствующие % β -гексозаминидазной активности

Рисунок 24 – Сравнение аллергенной активности аллергокомпонентов Can f 1 – Can f 6

Анализ активности дегрануляции базофилов продемонстрировал, что аллергены Can f 1, Can f 4 и Can f 5 вызывали положительные реакции у 68,75%, 50% и 61,5% пациентов с аллергией на собаку соответственно. В свою очередь, аллерген Can f 6 вызывал дегрануляцию базофилов только у 25% исследуемых пациентов. Аллергокомпоненты Can f 1, Can f 4 и Can f 5 показали наибольшую аллергенную активность среди исследованных молекул, что указывает на их ключевую роль в патогенезе аллергии на собак и подтверждает их значимость в контексте клинических аллергии на собаку (рисунок 24). В качестве контроля для оценки β -гексозаминидазной активности использовали стимуляцию сывороточным альбумином человека. Сывороточный альбумин человека не приводил к дегрануляции базофилов, что подтверждает отсутствие аллергенной активности в контрольной группе.

3.5. Ингибирование CCD-производных Can f 5, полученного в дрожжевой системе экспрессии методом иммуноферментного анализа

Результаты ингибирующего ИФА подтвердили, что у некоторых пациентов, сенсibilизированных к Can f 5, определяется IgE-реактивность как к белковому компоненту самого аллергена, так и к углеводным кросс-реактивным детерминантам (CCD). У пациента №1 наблюдалось снижение связывания IgE-антител к рекомбинантному Can f 5, полученному в дрожжевой системе экспрессии, на 36% после предварительной инкубации с CCD-блокатором (таблица 13). Это свидетельствует, что происходит связывание IgE-антител не только с натуральными эпитопами Can f 5, но также и с CCD. У других пациентов с сенсibilизацией к Can f 5 аналогичный ингибирующий эффект не был выявлен, указывая, что происходит преимущественное связывание с эпитопами Can f 5

Примечательно, что, за исключением пациента №1, уровни связывания IgE с Can f 5, экспрессированным в *Escherichia coli*, после обработки CCD-блокатором оставались на уровне, аналогичном связыванию с Can f 5, полученным в дрожжевой системе, что указывает на отсутствие заметного влияния CCD у остальных участников исследования.

Среди 110 обследованных субъектов, у которых была выявлена IgE-реактивность к CCD при отсутствии клинически выраженной аллергии на собак, в четырех случаях (пациенты № 12, 16, 17 и 18) было установлено, что связывание антител происходило исключительно с углеводными структурами дрожжевого происхождения, в то время как белковая часть Can f 5 не вызывала иммунного ответа (таблица 13).

Полученные данные подчёркивают необходимость осторожной интерпретации результатов серологических анализов на специфические IgE к Can f 5. Выявленная возможность перекрёстной реактивности с CCD может стать причиной ложноположительных результатов, не отражающих истинную клиническую значимость сенсибилизации к аллергену Can f 5.

Таблица 13 – Связывание IgE с Can f 5, экспрессированным в дрожжах и *E. coli*, при наличии и отсутствии CCD-блокатора: средние значения OD и процент ингибирования

CCD blocker	rCan f 5 (<i>yeast</i>)			rCan f 5 (<i>E. coli</i>)
	Нет	Да	% ингибирования	Нет
Пациент 1	0.596	0.379	36.4	0.407
Пациент 2	0.263	0.262	0.6	0.263
Пациент 9	0.408	0.439	0.0	0.509
Пациент 19	0.251	0.252	0.0	0.221
Пациент без аллергии 1	0.157	-	-	0.118
Буфер 1	0.10			
Пациент 12	0.747	0.191	74.4	0.171
Пациент 16	0.306	0.197	35.7	0.160
Пациент 17	0.246	0.191	22.3	0.172
Пациент 18	0.270	0.169	37.4	0.173
Пациент без аллергии 2	0.193	-	-	0.181
Буфер 2	0.13			

3.6. Оценка профиля сенсibilизации к молекулярным аллергенам собаки Can f 1 - Can f 6 у пациентов с аллергией на собаку

В данное исследование было включено 86 пациентов в возрасте от 19 до 73 лет с диагнозом аллергии на собаку, подтвержденным на основании клинических симптомов (астма, ринит, конъюнктивит, атопический дерматит), а также положительных аллергологических кожных проб на экстракт собаки. У большинства пациентов был диагностирован ринит (87,2%) и конъюнктивит (84,8%), которые возникали при контакте с животным. Согласно результатам анкетирования, 59,1% пациентов также страдали аллергией на кошек, 19,7% – на лошадей, а 51,1% имели аллергию на клещей домашней пыли.

В исследовании проводилось количественное определение аллерген-специфических антител (IgE) к аллергенам собаки Can f 1 – Can f 6 (n = 86) и антител к экстракту собаки (n = 51) с использованием метода ImmunoCAP. Частоты распознавания IgE-антител к индивидуальным аллергенам собаки Can f 1 - Can f 6 в общей популяции составили: 89,53% для Can f 1, 66,28% для Can f 2, 29,07% для Can f 3, 77,91% для Can f 4, 82,56% для Can f 5 и 69,77% для Can f 6. Пороговое значение для сенсibilизации к аллергенам собаки было установлено на уровне 0,1 кЕДА/л. Наибольшие средние значения антител IgE наблюдали для аллергенов Can f 1 (9,84 кЕДА/л), Can f 5 (9,87 кЕДА/л) и Can f 6 (9,41 кЕДА/л). Наибольшие медианные значения IgE наблюдали для аллергенов Can f 1 (2,75 кЕДА/л), Can f 4 (1,20 кЕДА/л) и Can f 5 (1,50 кЕДА/л) (таблица 14).

Также отмечено, что наиболее высокие уровни суммарного IgE к аллергенам собаки были зафиксированы у пациентов с астмой (48,68 кЕДА/л) и атопическим дерматитом (46,53 кЕДА/л). Моносенсibilизация наблюдалась исключительно в группе пациентов реактивных к Can f 5. Чаще всего пациенты демонстрировали мультисенсibilизацию, охватывающую 4 (n = 19), 5 (n = 26) или 6 аллергенов (n = 17) собаки.

У 51 пациента была исследована сенсibilизация к экстракту собаки методом ImmunoCAP. Результаты показали, что 45 пациентов (88,2%) имели IgE-

сенсibilизацию к экстракту собаки. Была обнаружена статистически значимая корреляция между суммарными уровнями аллерген-специфических IgE к молекулам Can f 1 – Can f 6 и уровнями специфического IgE к экстракту собаки. Для оценки корреляции был использован коэффициент корреляции Пирсона ($R = 0,86$; $p < 0,0001$) (рисунок 26). В данной когорте пациентов средний уровень суммарного IgE к Can f 1 – Can f 6 (30,26 кЕдА/л) был выше, чем уровень IgE, специфичный к экстракту собаки (16,00 кЕдА/л). Также среднее значение IgE к комбинации Can f 1 + Can f 4 + Can f 5 (21,41 кЕдА/л) превышало уровень IgE, специфичный к экстракту собаки. С использованием метода ImmunoCAP было установлено, что 88% исследуемых пациентов было сенсibilизировано к экстракту собаки. При этом 100% исследуемых пациентов имели сенсibilизацию хотя бы к одному из рекомбинантных аллергенов собаки. Это свидетельствует о возможности использования аллергенов Can f 1 – Can f 6 для замены экстракта собаки при измерении уровней аллерген-специфических IgE.

Сенсibilизация к Can f 5 была использована в качестве маркера истинной аллергии на собаку, поскольку аллергены Can f 1, Can f 2, Can f 4 и Can f 6 относятся к семейству липокалинов и обладают кросс-реактивностью с липокалинами других видов животных (например, Fel d 4, Fel d 7, Equ c 1). Пороговое значение для сенсibilизации к аллергену Can f 5 было установлено на уровне 0,1 кЕдА/л. Когорта пациентов, сенсibilизированных к Can f 5, составила 71 пациента, из которых 85,9% были сенсibilизированы к Can f 1, 59,2% – к Can f 2, 33,8% – к Can f 3, 73,2% – к Can f 4 и 62% – к Can f 6 (рисунок 25). Таким образом, аллергены Can f 1, Can f 4 и Can f 5 являются наиболее значимыми при аллергии на собаку. Согласно анализу дегрануляции базофилов аллерген Can f 6 проявляет менее выраженные аллергенные свойства. Примечательно, что среди аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4 и Can f 5 наивысшее среднее значение концентрации аллерген-специфических антител было отмечено к аллергену Can f 6 (23,51 кЕдА/л) в когорте пациентов с атопическим дерматитом. Кроме того, в общей когорте пациентов, среднее значение IgE к Can f 6 было на уровне 17,16 кЕдА/л, а медианное значение также доминировало в сравнении с другими аллергенами (1,64

кЕДА/л), что может свидетельствовать о потенциальной роли Can f 6 в патогенезе атопического дерматита для данной когорты пациентов [4,5,8].

Аллерген Can f 5, будучи членом семейства калликреинов с преобладающей локализацией в простате собаки и отсутствием кросс-реактивности с эпидермальными аллергенами кошек и лошадей, может рассматриваться как высокоспецифический маркер для диагностики аллергии на собаку. Суммируя, можно сделать вывод, что рекомбинантные аллергены Can f 1, Can f 4, Can f 5 позволяют точно диагностировать аллергию на собаку и в дальнейшем могут быть использованы для создания новых методов иммунопрофилактики аллергии на собаку.

Таблица 14 – Демографические, серологические и клинические характеристики пациентов с аллергией на собаку общей когорты пациентов

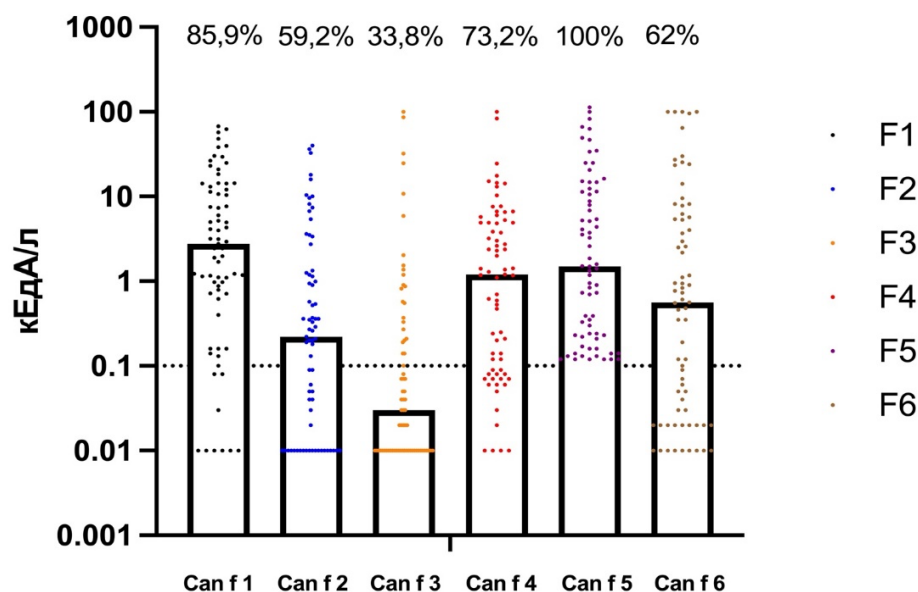
Клинические и демографические данные					
Демографические данные	Все пациенты	А	Р	К	АД
Количество пациентов (N)	86	36	75	73	31
Возраст (среднее, мин-макс)	31,59 (19 - 57)	32,3 (18 - 73)	31,1 (18 - 73)	30,9 (18 - 73)	30 (19 - 48)
Мужчины, N (%)	53 (61,6%)	26 (49,06%)	46 (86,79%)	47 (88,68%)	19 (35,85%)
Женщины, N (%)	33 (38,3%)	10 (30,30%)	29 (87,88%)	26 (78,79%)	12 (36,36%)
Уровень IgE к аллергенам Can f 1 - Can f 6					
Демографические данные	Все пациенты	А	Р	К	АД
IgE к Can f 1, среднее кЕДА/л	9,84	12,19	10,01	10,55	12,53
IgE к Can f 1, медиана кЕДА/л	2,75	4,30	3,03	2,84	6,34
мин-макс	0 - 67,29	0 - 67,29	0 - 67,29	0 - 67,29	0 - 67,29
N (%)	77 (89,53%)	33 (42,86%)	67 (87,01%)	65 (84,42%)	30 (38,96%)

Продолжение таблицы 14

1	2	3	4	5	6
IgE к Can f 2, среднее кЕдА/л	2,95	4,78	3,13	3,17	4,21
IgE к Can f 2, медиана кЕдА/л	0,22	0,36	0,21	0,24	0,32
мин-макс	0 - 39,8	0 - 39,8	0 - 39,8	0 - 39,8	0 - 39,8
N (%)	57 (66,28%)	29 (50,88%)	49 (85,96%)	48 (84,21%)	25 (43,86%)
IgE к Can f 3, среднее кЕдА/л	3,17	6,52	3,12	3,28	3,99
IgE к Can f 3, медиана кЕдА/л	0,03	0,04	0,04	0,04	0,02
мин-макс	0 - 100	0 - 100	0 - 100	0 - 100	0 - 85,85
N (%)	25 (29,07%)	11 (44,00%)	23 (92,00%)	23 (92,00%)	6 (24,00%)
IgE к Can f 4, среднее кЕдА/л	5,46	4,66	5,69	5,84	5,18
IgE к Can f 4, медиана кЕдА/л	1,20	2,37	1,19	1,19	2,97
мин-макс	0 - 100	0 - 24,4	0 - 100	0 - 100	0,06 - 24,4
N (%)	67 (77,91%)	30 (44,78%)	59 (88,06%)	57 (85,07%)	29 (43,28%)
IgE к Can f 5, среднее кЕдА/л	9,87	10,21	8,09	8,87	3,47
IgE к Can f 5, медиана кЕдА/л	1,50	4,37	1,25	1,46	3,65
мин-макс	0 - 113	0 - 100	0 - 100	0 - 100	0 - 16,3
N (%)	71 (82,56%)	29 (40,85%)	62 (87,32%)	62 (87,32%)	22 (30,99%)
IgE к Can f 6, среднее кЕдА/л	9,41	10,32	9,24	9,47	17,16
IgE к Can f 6, медиана кЕдА/л	0,56	0,95	0,59	0,56	1,64
мин-макс	0 - 100	0 - 100	0 - 100	0 - 100	0,01 - 100

Продолжение таблицы 14

1	2	3	4	5	6
N (%)	60 (69,77%)	30 (50,00%)	51 (85,00%)	51 (85,00%)	24 (40,00%)
Суммарный IgE, среднее кЕдА/л	40,7	48,68	39,28	41,17	46,53
Суммарный IgE, медиана кЕдА/л	13,44	26,27	12,17	12,17	23,56
мин-макс	0,12 - 269,93	0,17 - 269,93	0,12 - 269,93	0,12 - 269,93	0,19 - 264,74
N (%)	79 (91,8%)	36 (45,57%)	75 (94,94%)	73 (92,41%)	31 (39,24%)
Сенсибилизация к другим аллергенам (анкетирование)					
1	2	3	4	5	6
Аллергия на кошку	51 (59,3%)	28 (54,90%)	48 (94,12%)	44 (86,27%)	17 (33,33%)
Аллергия на лошадь	17 (19,7%)	11 (64,71%)	14 (82,35%)	14 (82,35%)	11 (64,71%)
Аллергия к клещам	44 (51,1%)	20 (45,45%)	41 (93,18%)	14 (31,82%)	15 (34,09%)



Примечание: Диаграмма рассеяния отображает уровни специфических IgE-антител (ось ординат, выраженные в кЕдА/л) к индивидуальным аллергенам собаки (ось абсцисс). Пунктирная линия на уровне 0,1 кЕдА/л указывает установленный порог аллергосенсибилизации на собаку. Столбцы показывают медианные уровни IgE-антител для каждого аллергена

Рисунок 25 – Уровни IgE-специфических антител к индивидуальным аллергокомпонентам собаки (Can f 1 – Can f 6) у группы пациентов, сенсибилизированных к Can f 5, определённые методом ImmunoCAP

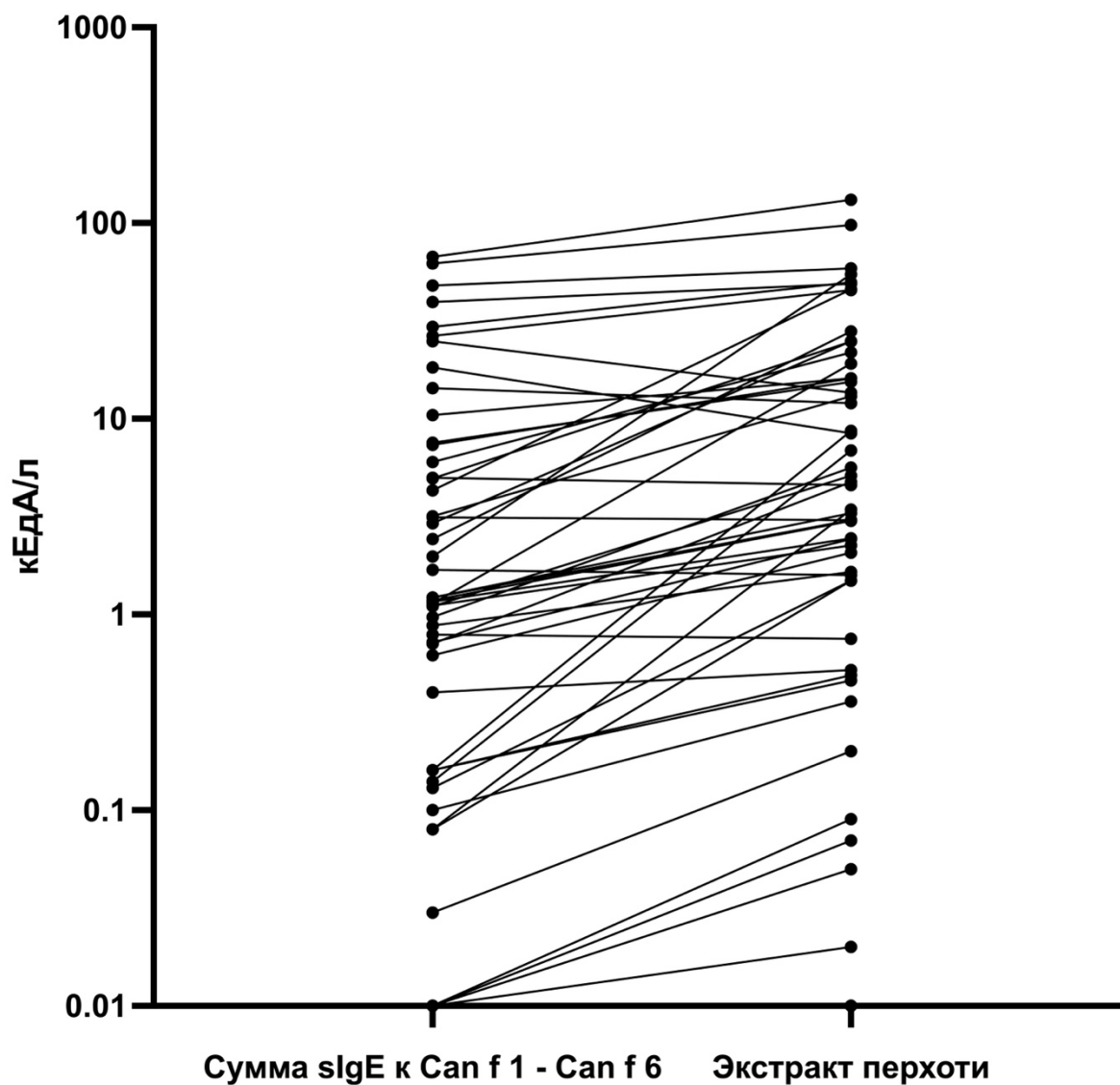


Рисунок 26 – Корреляция между суммой IgE-специфических антител к Can f 1 – Can f 6 и уровнем IgE к экстракту собаки. Коэффициент корреляции Пирсона (R) = 0,86; $p < 0,0001$

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках настоящего исследования впервые проведён комплексный анализ сенсibilизации к индивидуальным молекулярным компонентам аллергенов собак у пациентов с подтверждённой клинической симптоматикой. В исследуемую панель были включены аллергены Can f 1 – Can f 6, представляющие наиболее значимые аллергены, при этом Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 были получены в рекомбинантной форме, а Can f 3 – в виде природного белка.

Для обеспечения высокой диагностической точности и специфичности рекомбинантных аллергенов, при их производстве осуществляли контроль их растворимости и корректной пространственной укладки. Подтверждение качества полученных белков осуществлялось с использованием методов полиакриламидного гель-электрофореза (ПААГ), масс-спектрометрии, кругового дихроизма и анализа дегрануляции тучных клеток. По итогам оценки было установлено, что все аллергены соответствовали критериям чистоты, сохраняли аллергенную активность и обладали правильной конформацией, необходимой для их применения в компонентной алергодиагностике.

Результаты, полученные в ходе работы, позволили выделить наиболее иммунологически значимые аллергены, вызывающие сенсibilизацию у пациентов с аллергией на собак. Дополнительно была проведена функциональная оценка аллергенов на модели клеточной линии, что дало возможность проанализировать их биологическую активность *in vitro*.

Ключевым этапом исследования стало определение уровня специфических IgE к компонентам Can f 1 – Can f 6 с использованием системы ImmunoCAP. Анализ показал, что наиболее часто встречающимися и клинически значимыми аллергенами у пациентов являются Can f 1, Can f 4 и Can f 5, для которых характерна как высокая частота сенсibilизации, так и выраженная аллергенная активность. Вместе с тем, Can f 6, несмотря на несколько меньшую аллергическую активность *in vitro* демонстрировал высокую степень IgE-связывания, что подтверждает его роль в патогенезе аллергических реакций на собак.

Особое внимание было уделено аллергену Can f 5, обладающему высокой специфичностью. Этот белок синтезируется преимущественно в предстательной железе самцов и относится к простатспецифическим антигенам. Учитывая высокую распространённость сенсibilизации к Can f 5, полученные данные имеют практическую значимость для клинического ведения пациентов. В случае моносенсibilизации к данному компоненту может быть рекомендовано избегание контакта с кобелями, что потенциально снижает риск обострения аллергических симптомов.

Профиль сенсibilизации в исследуемой когорте указывает на наибольшую частоту положительных реакций к Can f 1, Can f 4 и Can f 5, что соответствует ранее опубликованным данным [2,3]. Однако следует учитывать, что липокалиновые белки, такие как Can f 1, Can f 2, Can f 4 и Can f 6, обладают выраженной молекулярной гомологией с аллергенами других видов, включая кошек (Fel d 4, Fel d 7) и лошадей (Equ s 1). Это обуславливает возможную кросс-реактивность, способную вызывать ложноположительные результаты при алергодиагностике.

Ввиду этого Can f 5 рассматривается как высокоспецифичный диагностический маркер, у которого отсутствует перекрёстная реактивность, что делает его особенно ценным для дифференциации истинной сенсibilизации к собакам. При этом было установлено, что у пациентов с положительной реакцией на Can f 5, аллергены Can f 1 и Can f 4 также демонстрировали диагностическую значимость.

Интерес представляет и сенсibilизация к Can f 3 – белку из группы сывороточных альбуминов, при которой чаще выявляется поливалентная аллергия. Такие пациенты, как правило, имеют комплексную клиническую картину, включающую бронхиальную астму, аллергический ринит, конъюнктивит и атопический дерматит. Учитывая высокую степень структурной гомологии Can f 3 с альбуминами других видов млекопитающих (Fel d 2 у кошек, Equ s 3 у лошадей, HSA у человека), у данной категории пациентов наблюдается повышенный риск перекрёстных аллергических реакций как на другие виды животных, так и на продукты животного происхождения.

Таким образом, представленные данные подчёркивают актуальность внедрения компонентной диагностики в рутинную клиническую практику. В отличие от традиционных кожных проб и тестов с аллергенными экстрактами, молекулярная диагностика позволяет более точно установить индивидуальный профиль сенсibilизации, тем самым минимизируя вероятность диагностических ошибок и способствуя подбору наиболее эффективной терапии.

Полученные результаты также открывают перспективы для разработки новых подходов к аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ), основанных на использовании молекулярно охарактеризованных аллергенов, а также способствуют формированию индивидуализированных рекомендаций по профилактике обострений у сенсibilизированных пациентов.

В целом, данное исследование подтверждает диагностическую и клиническую ценность компонентного анализа аллергенов Can f 1 – Can f 6 и подчёркивает его роль в создании персонализированных стратегий диагностики и лечения. Перспективным направлением будущих исследований является дальнейшее изучение перекрёстной реактивности между аллергенами различных зоологических источников и повышение эффективности АСИТ с учётом индивидуального сенсibilизационного профиля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование подтвердило высокую значимость компонентной диагностики аллергии на собак и необходимости оценки IgE-реактивности к аллергенам Can f 1 – Can f 6. Результаты работы подчеркивают важность персонализированного подхода в диагностике и лечении аллергии. Будущие исследования должны быть направлены на изучение кросс-реактивности между аллергенами различных семейств и разработку эффективных стратегий АСИТ с учетом индивидуальных профилей сенсibilизации пациентов. В рамках настоящего исследования была проведена компонентная аллергодиагностика у пациентов с клинически подтверждённой аллергией на собак, с применением панели молекулярных аллергенов Can f 1 – Can f 6. В ходе работы были получены и подробно охарактеризованы рекомбинантные формы Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6. Метод определения уровня специфических IgE с использованием платформы ImmunoCAP позволил установить, что основными мажорными аллергенами являются Can f 1, Can f 4 и Can f 5. Эти молекулы продемонстрировали как высокую аллергенную активность, так и значительную распространённость сенсibilизации в исследуемой популяции.

Особое внимание в работе уделено молекулярному аллергену Can f 5, который был предложен в качестве высокоспецифичного маркера аллергии на собак. Свойства данного аллергена позволяют дифференцировать истинную сенсibilизацию к собакам от перекрёстных реакций с другими аллергенами, что представляет клиническую ценность при выборе стратегии терапии и профилактики.

Дополнительно установлено, что пациенты с сенсibilизацией к сывороточному альбумину Can f 3 чаще характеризуются поливалентным профилем сенсibilизации и имеют повышенные уровни специфических IgE ко всем основным аллергенам собак, что может свидетельствовать о наличии поливалентной формы аллергии и тяжёлого течения заболевания.

Полученные данные подчёркивают актуальность внедрения компонентной диагностики в практику клинической иммунологии и аллергологии. В отличие от традиционных кожных тестов и анализа экстрактов аллергенов, молекулярный подход обеспечивает более точную идентификацию причинно-значимых аллергенов, снижая риск гипердиагностики и повышая эффективность подбора индивидуализированного лечения.

Результаты данного исследования открывают перспективы для разработки новых направлений аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ), основанной на применении молекулярной аллергодиагностики пациентов. Это также создаёт предпосылки для формирования персонализированных клинических рекомендаций и стратегий избегания аллергенов у пациентов с подтверждённой сенсibilизацией.

Таким образом, проведённое исследование подтвердило высокую диагностическую значимость анализа IgE-специфичности к отдельным компонентам Can f 1 – Can f 6 и обосновало необходимость перехода к персонализированному подходу в диагностике и терапии аллергии на собак. Будущие научные разработки должны быть ориентированы на дальнейшее изучение механизмов молекулярной кросс-реактивности между аллергенами различных биологических источников, а также на создание эффективных схем АСИТ с учётом индивидуального иммунного профиля пациента.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны и получены штаммы-продуценты *E. coli*, экспрессирующие рекомбинантные аллергены Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6, что обеспечивает возможность их использования в молекулярной диагностике аллергии на собак.

2. Разработаны высокоэффективные протоколы получения рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 в растворимой форме. Достигнута высокая стабильность, биологическая активность и воспроизводимость их получения, что делает возможным их применение в диагностике аллергии на собаку.

3. Проведена молекулярно-биологическая характеристика рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6, установлена их аллергенная активность с использованием клеточной модели базофильного лейкоза крысы. Показано, что Can f 1, Can f 4 и Can f 5 являются наиболее аллергенными компонентами собак.

4. Разработан и успешно применен метод модификации молекулярных аллергенов Can f 1 – Can f 6 с использованием биотиновой метки, что позволило обеспечить высокочувствительную и специфичную детекцию аллерген-специфических антител с помощью иммунокэпов со стрептавидином.

5. Определена диагностическая значимость аллергенов Can f 1 – Can f 6. Показано, что Can f 1, Can f 4 и Can f 5 являются мажорными аллергенами, играющие ключевую роль в сенсibilизации пациентов, что делает их перспективными мишенями для персонализированной диагностики и разработки новых методов лечения аллергии на собак. Аллерген Can f 5 предложен в качестве маркера истинной аллергической сенсibilизации на собаку, который позволяет проводить более точную диагностику и снизить риск ложноположительных результатов, связанных с перекрестной реактивностью липокалинов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Определения специфического IgE к Can f 1 – Can f 6 позволяет достоверно выявлять сенсibilизацию к аллергенам. При диагностике аллергии на собаку рекомендуется использовать ImmunoCAP или другие молекулярные тесты на основе алергокомпонентов, позволяющие дифференцировать сенсibilизацию к конкретным аллергенам.

Аллерген Can f 5 является высокоспецифическим маркером аллергии на собаку и рекомендуется для включения в диагностические протоколы для снижения ложноположительных результатов за счет кросс-реактивности между различными семействами эпидермальных аллергенов.

При выявленной моносенсibilизации к Can f 5 рекомендуется избегать контакта с самцами собак, тогда как контакт с самками может быть допустим.

Пациентам с аллергией на собаку следует проходить алерготестирование на компоненты Can f 1 – Can f 6, чтобы определить индивидуальные риски и факторы сенсibilизации.

В случае выявления сенсibilизации к липокалинам (Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 6) пациентам следует избегать контакта не только с собаками, но и с кошками (Fel d 4, Fel d 7) и лошадьми (Equ c 1).

Полученные данные могут быть использованы для разработки новых диагностических тестов, основанных на рекомбинантных аллергенах собак.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- E. coli* – *Escherichia coli*;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия;
- IUIS – международный союз иммунологических обществ (International Union of Immunological Societies);
- ELISA – иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assay);
- IgE – иммуноглобулин класса E;
- IgG – иммуноглобулин класса G;
- мРНК – матричная РНК;
- ИФА – иммуноферментный анализ;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- Can f – белки семейства *Canis Familiaris*;
- CCD – перекрестно-реактивные углеводные детерминанты (cross-reactive carbohydrate determinants);
- ImmunoCAP – коммерческая диагностическая система для выявления специфических IgE;
- ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа;
- IPTG – изопропил- β -D-тиогалактозид;
- LB – питательная среда Luria-Bertani;
- His-tag - гистидиновая метка;
- ОП600 – оптическая плотность при 600 нм;
- ОЕ – оптические единицы;
- PSA - простатспецифический антиген;
- MALDI-TOF – масс-спектрометрия с лазерной десорбцией (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight);
- RBL – клеточная линия базофильного лейкоза крысы (rat basophilic leukemia);
- Th1 – Т-хелперы 1-го типа;
- Th2 – Т-хелперы 2-го типа;

- Treg - T – регуляторные клетки;
- DC – дендритные клетки;
- GM-CSF – колониестимулирующий фактор для гранулоцитов и макрофагов (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor);
- APC – антиген-презентирующие клетки;
- IL – интерлейкины;
- MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex);
- FcεRI – высокоаффинный рецептор для IgE, участвующий в запуске аллергических реакций;
- TLR – toll-подобные рецепторы, распознающие патогены;
- CRD – компонентная диагностика (component resolved diagnostics);
- ISAC – Immuno Solid-phase Allergen Chip, мультиплексная платформа для диагностики аллерген-специфических IgE
- АСИТ – аллерген-специфическая иммунотерапия;
- BCA – бычий сывороточный альбумин;
- ФСБ – фосфатно-солевой буфер
- Fel d 1 – мажорный аллерген семейства *Felis domesticus*
- ADCC – антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (antibody-dependent cellular cytotoxicity);
- PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular pattern);
- DAMP – молекулярные паттерны, связанные с повреждением тканей (damage-associated molecular patterns);
- TFH – Т-фолликулярные хелперные клетки (T-follicular helper cells);
- PD-1 – рецептор программируемой клеточной смерти-1 (programmed death-1);
- CTLA-4 – цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4);
- NF-κB – ядерный фактор κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells);

РВМС – мононуклеарные клетки периферической крови (peripheral blood mononuclear cells);

Fab – антигенсвязывающий фрагмент антитела (fragment antigen-binding).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аллергочипы в молекулярной диагностике: от когортной оценки к персонализированному ведению пациента / К.А. Рябова, Е.М. Козлов, Д.Р. Трифонова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2025. – № 24(1). – С. 10-26. – DOI: 10.17650/1726-9784-2025-24-1-10-26.

2. Молекулярный профиль сенсibilизации к аллергенам собаки: диагностика с использованием «АллергочипРФ» / Е. М. Козлов, Д. Р. Трифонова, К. А. Рябова [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2025. – № 1. – С. 59-67. – DOI: 10.14427/jipai.2025.1.59.

3. Оценка уровней специфических IgE к мажорным аллергенам Fel d 1 И Can f 1 с применением диагностических платформ «АллергочипРФ» И ImmunoCAP / Е. М. Козлов, Д. Р. Трифонова, К. А. Рябова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2025. – № 180(7). – С. 76-80. – DOI: 10.47056/0365-9615-2025-180-7-76-80.

4. Патент № 2845385 С1 Российская Федерация, МПК С07К 14/47, G01N 33/68, А61К 39/35. Рекомбинантный аллерген Can f 5, полученный в клетках E.coli : № 2024113523: заявл. 20.05.2024 : опубл. 18.08.2025 / Е. М. Козлов, Д. Р. Трифонова, Н. В. Гороховец [и др.]; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 19 с. – Текст : непосредственный.

5. Получение панели молекулярных аллергенов собак Can f 1 - Can f 6 с целью создания продвинутого диагностического метода выявления аллергии на собак / Е. М. Козлов, А. Р. Галашин, К. А. Рябова [и др.] // Первый межрегиональный конгресс по аллергологии и иммунологии: сборник тезисов. – Москва : Общество с ограниченной ответственностью «Смарт», 2023. – С. 23-24. – Текст : непосредственный.

6. Профили молекулярной сенсibilизации к аллергенам пушных животных у пациентов Российской Федерации. / Е. Ф. Жукалина, А. Н. Пампура, Т. Н. Суровенко [и др.] // Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. – 2024. – № 103. – Р. 17-26.

7. Современная концепция молекулярной диагностики аллергии на собак / Е. М. Козлов, А. А. Дубовец, К. А. Рябова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 175. – № 6. – С. 664-669. – DOI 10.47056/0365-9615-2023-175-6-664-669.

8. Сравнение данных по использованию аллергочипов в практике для оценки профиля сенсibilизации в когортах / А. Р. Галашин, К. А. Рябова, Е. М. Козлов [и др.] // Первый межрегиональный конгресс по аллергологии и иммунологии: сборник тезисов. – Москва : Общество с ограниченной ответственностью «Смарт», 2023. – С. 12. – Текст : непосредственный.

9. Характеристика аллергенов кошки / К. А. Рябова, Е. М. Козлов, Д. Трифонова [и др.] // Иммунология. – 2023. – Т. 44. – № 3. – С. 368-378. – DOI: 10.33029/0206-4952-2023-44-3-368-378.

10. A population-based study of animal component sensitization, asthma, and rhinitis in schoolchildren / A. Bjerg, A. Winberg, M. Berthold [et al.] // *Pediatric Allergy and Immunology*. – 2015. – № 6. – P. 557-563.

11. Accuracy of immunoblotting assay for detection of specific IgE compared with ImmunoCAP in allergic patients / R. Shokouhi Shoormasti, M. Reza Fazlollahi, A. Kazemnejad [et al.] // *Electronic Physician*. – 2017. – № 2. – P. 6327-6332.

12. Activation of TLR Signaling in Sensitization-Recruited Inflammatory Monocytes Attenuates OVA-Induced Allergic Asthma / C. Huang, J. Wang, X. Zheng [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – № 9. – P. 2591.

13. Affinity purification of a major and a minor allergen from dog extract: Serologic activity of affinity-purified Can f I and of Can f I-depleted extract / H. De Groot, K. G. Goei, P. van. Swieten [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 1991. – № 6. – P. 1056-1065.

14. Akkaya, M. B cell memory: building two walls of protection against pathogens / M. Akkaya, K. Kwak, S. K. Pierce // *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – № 4. – P. 229-238.

15. Albumins represent highly cross-reactive animal allergens / Z. Liu, D. Trifonova, E. Kozlov [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – № 14. – P. 1241518.

16. Allergy Diagnostic Testing: An Updated Practice Parameter / I. L. Bernstein, J. T. Li, D. I. Bernstein [et al.] // *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. – 2008. – № 3. – P. 1-148.

17. Analysis of feline and canine allergen components in patients sensitized to pets / N. Ukleja-Sokołowska, E. Gawrońska-Ukleja, M. Żbikowska-Gotz [et al.] // *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. – 2016. – № 1. – P. 61.

18. Analysis of Sensitization Profiles in Central European Allergy Patients Focused on Animal Allergen Molecules / M. Vachová, P. Panzner, T. Vlas [et al.] // *International Archives of Allergy and Immunology*. – 2020. – № 4. – P. 278-284.

19. Apostol, A. C. Training the Fetal Immune System Through Maternal Inflammation – A Layered Hygiene Hypothesis / A. C. Apostol, K. D. C. Jensen, A. E. Beaudin // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – № 11. – P. 123.

20. Assessment of recombinant dog allergens Can f 1 and Can f 2 for the diagnosis of dog allergy / S. Saarelainen, A. Taivainen, M. Rytönen-Nissinen [et al.] // *Clinical & Experimental Allergy*. – 2004. – № 10. – P. 1576-1582.

21. Atopic dermatitis: immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies / M. Furue, T. Chiba, G. Tsuji [et al.] // *Allergology International*. – 2017. – № 3. – P. 398-403.

22. Can f 1 levels in hair and homes of different dog breeds: Lack of evidence to describe any dog breed as hypoallergenic / D. W. Vredegoor, T. Willemse, M. D. Chapman [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2012. – № 4. – P. 904-909.

23. Canis familiaris allergen Can f 6: expression, purification and analysis of B-cell epitopes in Chinese dog allergic children / Y. -J. Wang, L. Li, W. -J. Song [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – № 53. – P. 90796-90807.

24. Cat is a major allergen in patients with asthma from west Siberia, Russia / E. S. Gusareva, E. J. Bragina, E. V. Deeva [et al.] // *Allergy*. – 2006. – № 4. – P. 509-510.

25. Characterization of the dog lipocalin allergen Can f 6: the role in cross-reactivity with cat and horse / O.B. Nilsson, J. Binmmyr, A. Zoltowska [et al.] // *Allergy*. – 2012. – № 6. – P. 751-757.

26. Clustering of conformational IgE epitopes on the major dog allergen Can f 1 / M. Curin, M. Weber, G. Hofer [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – № 1. – P. 12135.

27. Consensus document on dog and cat allergy / I. Dávila, J. Domínguez-Ortega, A. Navarro-Pulido [et al.] // *Allergy*. – 2018. – № 6. – P. 1206-1222.

28. Crotty, S. T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease / S. Crotty // *Immunity*. – 2014. – № 4. – P. 529-542.

29. Crystal structure of the dog allergen Can f 6 and structure-based implications of its cross-reactivity with the cat allergen Fel d 4 / K. Yamamoto, O. Ishibashi, K. Sugiura [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – № 1. – P. 1503.

30. Crystal Structure of the Dog Lipocalin Allergen Can f 2: Implications for Cross-reactivity to the Cat Allergen Fel d 4 / C. Madhurantakam, O. B. Nilsson [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2010. – № 1. – P. 68-83.

31. DichroWeb – веб-сайт для расчёта вторичной структуры белка по данным спектроскопии кругового дихроизма: сайт: офиц. сайт. – URL: <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/> (дата обращения 23.02.2025).

32. Dog allergy: can a prevalent or exclusive sensitization to Can f 5 be considered a lucky or negative event in «real life»? / G. Liccardi, L. Calzetta, A. Salzillo [et al.] // *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*. – 2018. – № 6. – P. 283.

33. EAACI Molecular Allergology User's Guide 2.0 / S. Dramburg, C. Hilger, A. F. Santos [et al.] // *Pediatric Allergy and Immunology*. – 2023. – № 28. – P. 13854.

34. Ellmeier, W. Tec family kinases: regulation of FcεRI-mediated mast-cell activation / W. Ellmeier, A. Abramova, A. Schebesta // *The FEBS Journal*. – 2011. – № 12. – P. 1990-2000.

35. Environmental Exposure to Allergens of Different Dog Breeds and Relevance in Allergological Diagnostics / A.R.R. Heutelbeck, T. Schulz, K. -C. Bergmann [et al.] // *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. – 2008. – № 11. – P. 751-758.

36. European Association of Allergy & Immunology: сайт: офиц. сайт. – URL: <https://eaaci.org/> (дата обращения 23.02.2025).

37. Exposure to Cats and Dogs, and Symptoms of Asthma, Rhinoconjunctivitis, and Eczema / B. Brunekreef, E. Von Mutius, G. Wong [et al.] // *Epidemiology*. – 2012. – № 5. – P. 742-750.

38. FcεRI Signaling in the Modulation of Allergic Response: Role of Mast Cell-Derived Exosomes / M. Lecce, R. Molfetta, N. D. Milito [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – № 15. – P. 5464.

39. Frequency of allergic sensitization to Can f 5 in North East Italy. An analysis of 1403 ISACs 112 (Component Resolved Diagnosis) collected retrospectively / D. Villalta, M. Milanese, M. Da Re [et al.] // *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*. – 2019. – № 4. – P. 186.

40. García-Gil, A. Beyond the antibody: B cells as a target for bacterial infection / A. García-Gil, L.U. Lopez-Bailon, V. Ortiz-Navarrete // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2019. – № 5. – P. 905–913.

41. Gilfillan, A.M. Integrated signalling pathways for mast-cell activation / A. M. Gilfillan, C. Tkaczyk // *Nature Reviews Immunology*. – 2006. – № 3. – P. 218–230.

42. Hernandez, L. Anaphylaxis / L. Hernandez, S. Papalia, G. G. A. Pujalte // *Primary Care: Clinics in Office Practice*. – 2016. – № 3. – P. 477-485.

43. Hsu, P. Foetal immune programming: hormones, cytokines, microbes and regulatory T cells / P. Hsu, R. Nanan // *Journal of Reproductive Immunology*. – 2014. – № 104. – P. 2-7.

44. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy / T. A. Patente, M. P. Pinho, A. A. Oliveira [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – № 9. – P. 3176.

45. Identification of a new major dog allergen highly cross-reactive with Fel d 4 in a population of cat- and dog-sensitized patients / C. Hilger, K. Swiontek, K. Arumugam [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2012. – № 4. – P. 1149-1151.

46. IgE Reactivity of the Dog Lipocalin Allergen Can f 4 and the Development of a Sandwich ELISA for Its Quantification / M. Rytkönen-Nissinen, S. Saarelainen, J. Randell [et al.] // *Allergy, Asthma & Immunology Research*. – 2015. – № 4. – P. 384.

47. Immune Responses to Inhalant Mammalian Allergens / F. Hentges, C. Cathy Léonard, K. Arumugam [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – № 5. – P. 54-63.

48. Individual airborne characteristics of dog allergens / A. Wintersand, M. Alsved, J. Jakobsson [et al.] // *Clinical & Experimental Allergy*. – 2021. – № 9. – P. 1221-1224.

49. Interactions Between Atopic Dermatitis and Staphylococcus aureus Infection: Clinical Implications / J. Kim, B. E. Kim, K. Ahn [et al.] // *Allergy, Asthma & Immunology Research*. – 2019. – № 5. – P. 593.

50. Jarvis, D. ABC of allergies: The epidemiology of allergic disease / D. Jarvis, P. Burney // *BMJ*. – 1998. – № 7131. – P. 607-610.

51. Johansson, S. ImmunoCAP Specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis / S. Johansson // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. – 2004. – № 3. – P. 273-279.

52. Johnson, W. C. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures / W. C. Johnson // *Proteins*. – 1999. – № 3. – P. 307-312.

53. Kleine-Tebbe, J. Molecular allergy diagnostics using IgE singleplex determinations: methodological and practical considerations for use in clinical routine: Part 18 of the Series Molecular Allergology / J. Kleine-Tebbe, T. Jakob // *Allergo Journal International*. – 2015. – № 6. – P. 185-197.

54. Koch, U. Mechanisms of T Cell Development and Transformation / U. Koch, F. Radtke // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2011. – № 1. – P. 539-562.

55. Kotsias, F. Antigen processing and presentation / F. Kotsias, I. Cebrian, A. Alloatti // *Elsevier*. – 2019. – № 4 – C. 69-121.

56. LeBien, T. W. B lymphocytes: how they develop and function / T. W. LeBien, T. F. Tedder // *Blood*. – 2008. – № 5. – P. 1570-1580.

57. Mak, T. W. Allergy and Hypersensitivity / T. W. Mak, M. E. Saunders // *Elsevier*. – 2006. – № 8. – P. 923-962.

58. Mast cell signaling: The role of protein tyrosine kinase Syk, its activation and screening methods for new pathway participants / R. P. Siraganian, R. O. de Castro, E. A. Barbu [et al.] // *FEBS Letters*. – 2010. – № 24. – P. 4933-4940.

59. Maternal allergic disease history affects childhood allergy development through impairment of neonatal regulatory T-cells / Meng S, R. Gao, B. Yan [et al.] // *Respiratory Research*. – 2016. – № 1. – P. 114.

60. Mechanisms of Key Innate Immune Cells in Early- and Late-Onset Preeclampsia / I. Aneman, D. Pienaar, S. Suvakov [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – № 11. – P. 1864.

61. Medvedev, A. E. Toll-Like Receptor Polymorphisms, Inflammatory and Infectious Diseases, Allergies, and Cancer / A. E. Medvedev // *Journal of Interferon & Cytokine Research*. – 2013. – № 9. – P. 467-484.

62. Mellman, I. Dendritic Cells: Master Regulators of the Immune Response / I. Mellman // *Cancer Immunology Research*. – 2013. – № 3. – P. 145-149.

63. Michels, K. R. TLR Activation and Allergic Disease: Early Life Microbiome and Treatment / K. R. Michels, N. W. Lukacs, W. Fonseca // *Current Allergy and Asthma Reports*. – 2018. – № 11. – P. 61.

64. Minnicozzi, M. Innate immunity in allergic disease / M. Minnicozzi, R. T. Sawyer, M. J. Fenton // *Immunological Reviews*. – 2011. – № 1. – P. 106-127.

65. Molecular Aspects of Allergens and Allergy / R. Valenta, A. Karaulov, V. Niederberger [et al.] // Elsevier. – 2018. – № 7. – P. 195-256.

66. Molecular characterization of dog albumin as a cross-reactive allergen / S. Spitzauer, C. Schweiger, W. R. Sperr [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 1994. – № 3. – P. 614-627.

67. Molecular diagnosis in cat allergy / F. -D. Popescu, C. S. Ganea, C. Panaitescu [et al.] // *World Journal of Methodology*. – 2021. – № 3. – P. 46-60.

68. Molecular sensitization patterns to cat and dog allergens in Lithuanian children population / A. Eidukaite, E. Gorbikova, M. Miskinyte [et al.] // *World Allergy Organization Journal*. – 2023. – № 10. – P. 100827.

69. Natural human Bet v 1-specific IgG antibodies recognize non-conformational epitopes whereas IgE reacts with conformational epitopes / G. Brazhnikov, E. Smolnikov, A. Litovkina [et al.] // *Allergy*. – 2023. – № 12. – P. 3136-3153.

70. Noval Rivas, M. Regulatory T cells in allergic diseases / M. Noval Rivas, T. A. Chatila // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2016. – № 3. – P. 639-652.

71. Pieper, K. B-cell biology and development / K. Pieper, B. Grimbacher, H. Eibel // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2013. – № 4. – P. 959-971.

72. Popescu, F.-D. Precision medicine allergy immunoassay methods for assessing immunoglobulin E sensitization to aeroallergen molecules / F. -D. Popescu, M. Vieru // *World Journal of Methodology*. – 2018. – № 3. – P. 17-36.

73. Powell, C. Type III hypersensitivity reaction with immune complex deposition in 2 critically ill dogs administered human serum albumin / C. Powell, L. Thompson, R. J. Murtaugh // *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. – 2013. – № 6. – P. 598-604.

74. Prevalence of allergy to human seminal fluid among women with allergy to male dog and sensitization to Can f 5 / D. González-de-Olano, M. Gandolfo-Cano, M. P. de-Calzada-Bustingorri [et al.] // *Clinical & Experimental Allergy*. – 2018. – № 10. – P. 1368-1370.

75. Recombinant IgE-Reactive Functional Can f 5 Devoid of Cross-Reactive Carbohydrate Determinants / E. Kozlov, D. Trifonova, A. Dubovets [et al.] // *Allergy*. – 2025. – Vol. 80. – № 6. – P. 1785-1789. – DOI: 10.1111/all.16465.

76. Relevance of specific IgE antibody titer to the prevalence, severity, and persistence of asthma among 19-year-olds in northern Sweden / M. S. Perzanowski, E. Ronmark, H. R. James [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2016. – № 6. – P. 1582-1590.

77. Romagnani, S. T Cell Subpopulations / S. Romagnani, K. C. Bergmann, J. Ring, S. Karger // *AG*. – 2014. – № 5 – P. 155-164.

78. Saraiva Camara, N. O. Lymphocyte Differentiation and Effector Functions / N. O. Saraiva Camara, A. P. Lepique, A. S. Basso // *Clinical and Developmental Immunology*. – 2012. – № 2012. – P. 1-3.

79. Sensitization phenotypes based on protein groups and associations to allergic diseases in children / A. M. M. Schoos, J. D. Kattan [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2016. – № 4. – P. 1277-1280.

80. Sensitization to cat and dog allergen molecules in childhood and prediction of symptoms of cat and dog allergy in adolescence: A BAMSE/MeDALL study / A. Asarnej, C. Hamsten, K. Wadén [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2016. – № 3. – P. 813-821.

81. Sensitization to Furry Animals and Clinical Relevance of House Dust Mite-Induced Allergic Rhinitis in Guangzhou / H. Chen, Z. Huang, W. Luo [et al.] // *International Archives of Allergy and Immunology*. – 2020. – № 7. – P. 488-498.

82. Sensitization to molecular dog allergens in an adult population: Results from the West Sweden Asthma Study / S. S. Özyugur Ermis, M. P. Borres [et al.] // *Clinical & Experimental Allergy*. – 2023. – № 1. – P. 88-104.

83. Serum Albumin as a Cross-Reactive Component in Furry Animals May Be Related to the Allergic Symptoms of Patients with Rhinitis / Z. Huang, H. Zhu, R. Lin [et al.] // *Journal of Asthma and Allergy*. – 2021. – № 14. – P. 1231-1242.

84. Sharma, E. A systematic review of allergen cross-reactivity: Translating basic concepts into clinical relevance / E. Sharma, J. Vitte // *Journal of Allergy and Clinical Immunology: Global*. – 2024. – № 2. – P. 100230.

85. Stress and Allergic Diseases / N. D. Dave, L. Xiang, K. E. Rehm [et al.] // *Immunology and Allergy Clinics of North America*. – 2011. – № 1. – P. 55-68.

86. Structural aspects of dog allergies: The crystal structure of a dog dander allergen Can f 4 / M. H. Niemi, M. Rytönen-Nissinen, J. Jänis [et al.] // *Molecular Immunology*. – 2014. – № 1. – P. 7-15.

87. Takeuchi, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation / O. Takeuchi, S. Akira // *Cell*. – 2010. – № 6. – P. 805-820.

88. "The detailed distribution of T cell subpopulations in immune-stable renal allograft recipients: a single center study / Q. Zhuang, B. Peng, W. Wei [et al.] // *PeerJ*. – 2019. – № 7. – P. 6417."

89. The European Federation of Allergy and Airways Diseases Patients' Associations: сайт: офиц. сайт. – URL: <https://www.efanet.org> (дата обращения 23.02.2025).

90. The Statistics Portal: сайт: офиц. сайт. – URL: <https://www.statista.com/> (дата обращения 23.02.2025).

91. Transfer of maternal immunity and programming of the newborn immune system / M. F. Jennewein, B. Abu-Raya, Y. Jiang [et al.] // *Seminars in Immunopathology*. – 2017. – № 6. – P. 605-613.

92. Using Component-Resolved Diagnosis to Characterize the Sensitization to Specific Cat and Dog Allergens in Patients with Allergic Respiratory Diseases in Catalonia, Spain / A. Roger, C. Lazo, N. Arias [et al.] // *International Archives of Allergy and Immunology*. – 2023. – № 5. – P. 440-446.

93. Uzzaman, A. Chapter 28: Classification of hypersensitivity reactions / A. Uzzaman, S.H. Cho // *Allergy and Asthma Proceedings*. – 2012. – № 3. – P. 96-99.

94. Van Hage, M. ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology / M. Van Hage, C. Hamsten, R. Valenta // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2017. – № 4. – P. 974-977.

95. Walter, S. Clemens von Pirquet: Preeminent researcher, teacher, clinician and advocate / S. Walter, L. C. Parish // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2023. – № 11. – P. 2171-2172.

96. Washing the dog reduces dog allergen levels, but the dog needs to be washed twice a week / T. Hodson, A. Custovic, A. Simpson [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 1999. – № 4. – P. 581-585.

97. Wegener's granulomatosis: Is biologic therapy useful? / P. Sarraf, J. Kay, R. P. Friday [et al.] // *Current Rheumatology Reports*. – 2006. – № 4. – P. 303-311.

98. Wernersson, S. Mast cell secretory granules: armed for battle / S. Wernersson, G. Pejler // *Nature Reviews Immunology*. – 2014. – № 7. – P. 478-494.

99. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Page: сайт: офиц. сайт. – URL: <https://allergen.org/> (дата обращения 23.02.2025).

100. Wide, L. Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies / L. Wide, H. Bennich, S. G. O. Johansson // *The Lancet*. – 1967. – № 7526. – P. 1105-1107.

101. World Allergy Organization: сайт: офиц. сайт. – URL: <https://www.worldallergy.org> (дата обращения 23.02.2025).