

На правах рукописи



Козлов Евгений Максимович

**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**

3.2.7. Иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Караулов Александр Викторович

Официальные оппоненты:

Пампура Александр Николаевич - доктор медицинских наук, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательский клинический институт педиатрии и детской хирургии имени академика Ю.Е. Вельтищева, заместитель директора по научной работе

Курбачева Оксана Михайловна - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, отделение бронхиальной астмы, заведующая отделением

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Защита диссертации состоится «16» декабря 2025 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.34 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор



Калужин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 аллергопробы являются эффективным методом диагностики аллергии, они не позволяют выявить конкретный аллерген, к которому сенсibilизированы пациенты, из-за характерной для них вариативности.

С развитием молекулярной аллергологии 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 аллергические заболевания, но и изучать характерные паттерны сенсibilизации, выявляя мультисенсibilизацию и кросс-реакции. Более того, в клинической практике особенно важно оценивать риски развития аллергических 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 аллергических 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 аллергенными 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 выявлять 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. 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.

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.

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 эти исследования не включали аллерген Can f 6.

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 было включено исследование молекул Can f 4 и Can f 6.

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.

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.

Цели 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 алергены Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5, Can f 6.
2. Создание и оптимизация протоколов получения рекомбинантных алергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5, Can f 6 в растворимой форме.
3. Охарактеризовать молекулярно-биологические свойства и алергенную активность рекомбинантных алергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5, Can f 6.
4. Модифицировать молекулярные алергены Can f 1 – Can f 6 с помощью биотиновой метки для возможности детекции алерген-специфических антител с помощью иммуноэпов со стрептавидином.
5. Оценка IgE-реактивности сывороток пациентов с аллергией на собаку к панели молекулярных алергенов Can f 1 – Can f 6 методом ImmunoCAP с целью определения диагностической значимости данных алергенов.

Научная новизна

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

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

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 аллерговакцины 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 аллергоисследований) Венского медицинского университета (заведующий лабораторией – 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 подвергали биотинилированию 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), включающий 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.

Таким образом, вклад автора является несомненным и определяющим на всех этапах настоящего исследования.

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 собаку.
2. Разработан метод получения рекомбинантного простатического калликрейна собак (Can f 5) в клетках *E. coli*, при котором не происходит включение перекрестно-

реактивных углеводных детерминант в структуру молекулы, что снижает вероятность возникновения 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 сенсибилизации 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 сенсибилизации 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 алергокомпоненты собак. Полученные данные не только способствуют совершенствованию методов диагностики, но и открывают перспективы для разработки новых подходов к лечению и профилактике аллергии, включая аллерген-специфическую иммунотерапию (АСИТ) и фармакологические методы воздействия на иммунную систему. Эти результаты имеют практическое значение и могут быть использованы для создания более эффективных терапевтических стратегий, направленных на снижение проявлений аллергических реакций и улучшение качества жизни пациентов.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы 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 аллергоисследований) Венского медицинского университета (MUW). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) – протокол от 16.02.2022 № 04-22.

Для реализации исследования был сформирован биобанк сывороток пациентов с клиническими проявлениями аллергии на собак. Сбор образцов проводился на базе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Городской клинической больницы № 52. 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.

Методы исследования

1. Разработка протоколов 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 с помощью методов генной инженерии.

2. Получение полной панели молекулярных аллергенов собак: Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 в растворимой форме. Изоляция аллергокомпонента Can f 3 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).

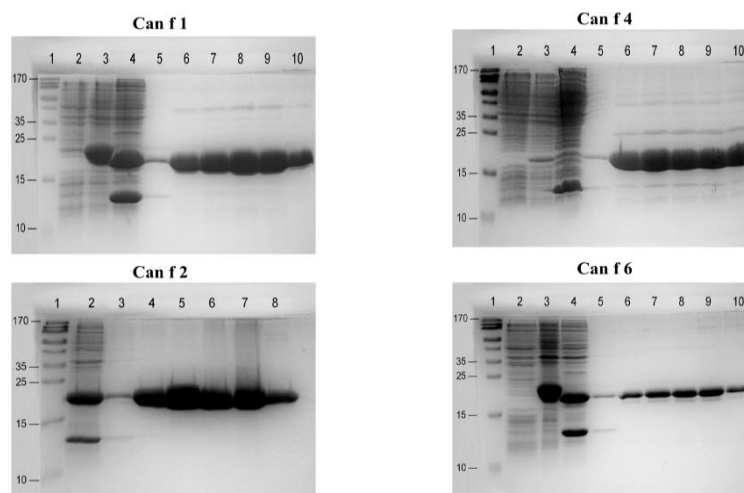
3. Биотинилирование аллергокомпонентов Can f 1 – Can f 6 для оценки IgE-реактивности с использованием иммунокэпов со стрептавидином.

4. Детекция аллергической сенсибилизации пациентов к аллергенам собаки методом ImmunoCAP.

5. Статистическая обработка данных с помощью GraphPad Prism (версия 10) и Python (версия 3.12). GraphPad Prism применялся для расчета описательной статистики, проведения корреляционного анализа и оценки статистической значимости результатов.

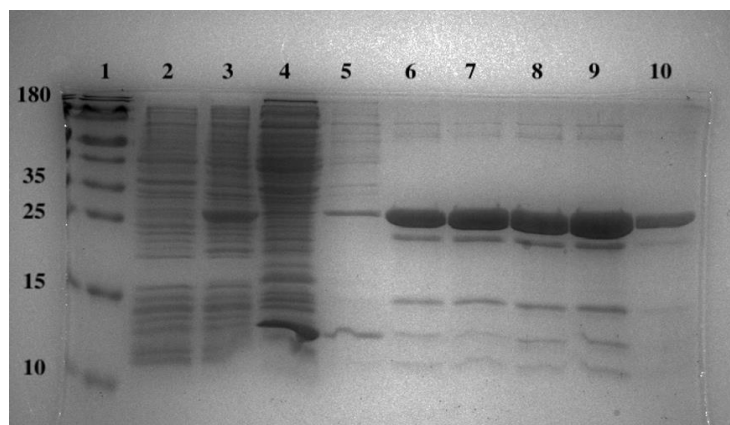
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании была разработана панель рекомбинантных аллергенов собак Can f 1 – Can f 6, что позволило провести оценку IgE-реактивности у пациентов с клинически установленной аллергией на собак. Полученные аллергены были охарактеризованы методами ПААГ электрофореза (рисунок 2-3), масс-спектрометрии (таблица 1), кругового дихроизма (рисунок 4-5), а также была произведена оценка их аллергенных свойств (таблица 2, рисунок 6).



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 1 – ПААГ электрофорез фракций рекомбинантных аллергенов в Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 6.



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 2 – ПААГ электрофорез фракций рекомбинантного аллергена Can f 5

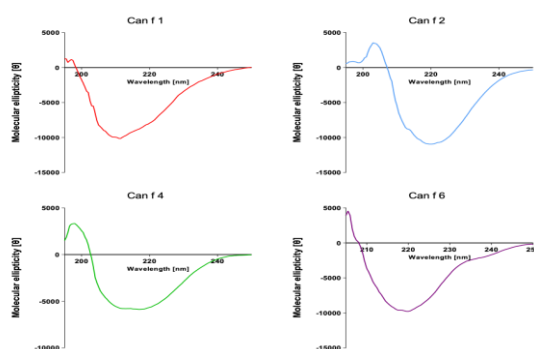
Для подтверждения молекулярных масс полученных рекомбинантных аллергенов использовали метод масс-спектрометрического анализа. В таблице 1 представлены теоретически рассчитанные молекулярные массы аллергенов на основе первичной структуры белка, а также экспериментально полученный молекулярный вес по данным

временной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF).

Таблица 1 – Молекулярная масса (кДа) белков Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Can f 5, 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 5	27,847	28,089
Can f 6	21,146	21,377

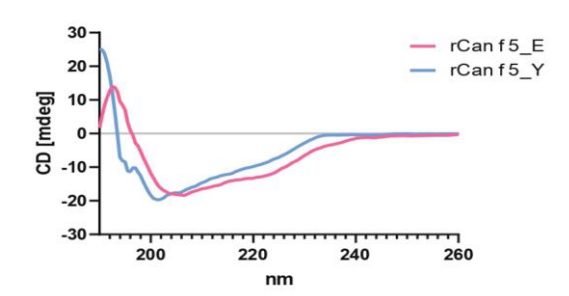
Для анализа вторичной структуры рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4 и Can f 6 был применён метод спектроскопии кругового дихроизма. Исследование проводилось на спектрополяриметре в УФ-области спектра (200 – 240 нм) с разрешением 0,5 нм и скоростью сканирования 50 нм/мин. Данный метод 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 DICHROWEB.



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 3 – Спектроскопия кругового дихроизма аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 6.

Ввиду того, что кристаллическая структура Can f 5 не известна был проведен сравнительный анализ спектров кругового дихроизма между рекомбинантным Can f 5, полученным в клетках *E. coli*, и коммерческим образцом Can f 5 (Recom Biotech) (рисунок 5).



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

Рисунок 4 – Сравнение спектров кругового дихроизма между рекомбинантным Can f 5 (rCan f 5_E) полученным в клетках *E. coli* и коммерческим рекомбинантным Can f 5 (rCan f 5_Y)

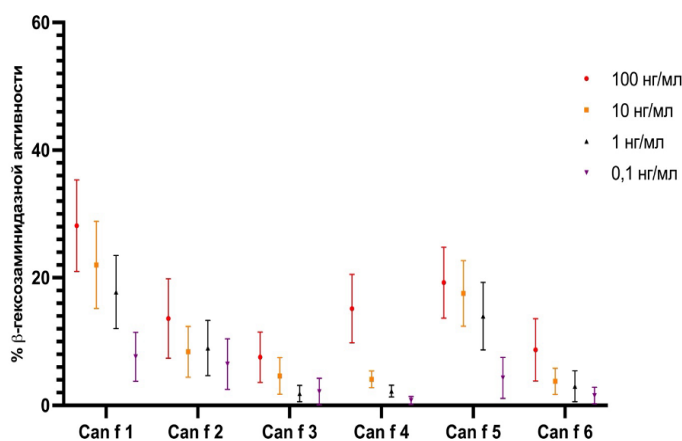
Для подтверждения физиологических свойств аллергенов Can f 1 – Can f 6 была проведена оценка их аллергенной активности с помощью метода дегрануляции базофилов (таблица 2). Для активации базофилов использовалась сыворотка 16 пациентов с подтвержденной сенсibilизацией на собаку. В качестве контроля использовали 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.

Таблица 2 – 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

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
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



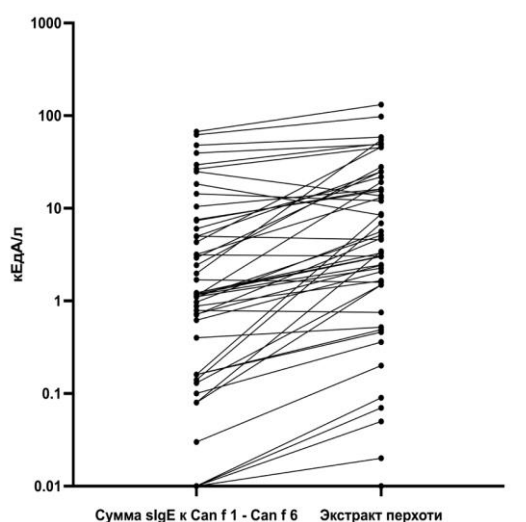
Примечание: По шкале абсцисс отложен % β-гексозаминидазной активности после стимуляции базофилов. По шкале ординат отложены концентрации аллергенов (0,1 – 100 нг/мл), соответствующие % β-гексозаминидазной активности

Рисунок 5 – Сравнение аллергенной активности алергокомпонентов 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. Алергокомпоненты Can f 1, Can f 4 и Can f 5 показали наибольшую алергенную 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 6). В качестве контроля для оценки β-гексозаминидазной активности использовали стимуляцию сывороточным альбумином человека. Сывороточный альбумин человека не приводил к дегрануляции базофилов, что подтверждает отсутствие алергенной активности в контрольной группе.

Для оценки IgE-реактивности у пациентов с аллергией на собаку использовали метод ImmunoCAP. 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). 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.

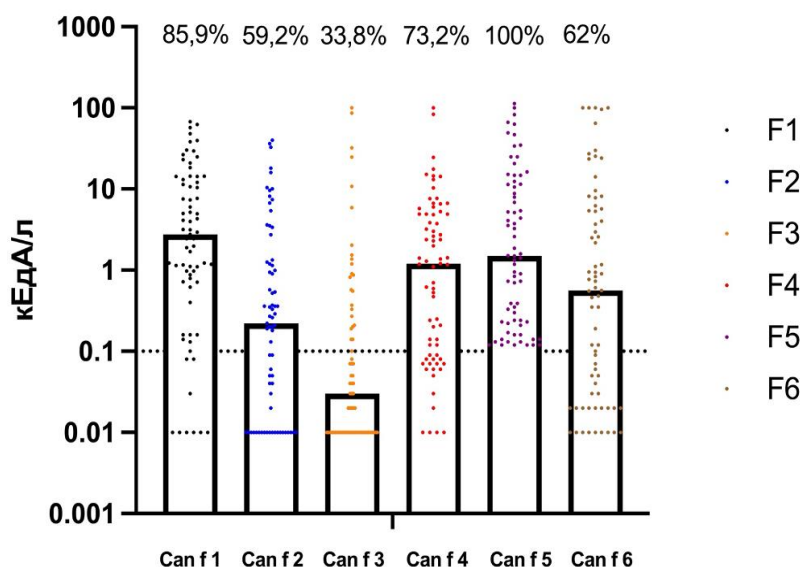
У 51 пациента была исследована сенсibilизация к экстракту собаки методом ImmunoCAP. Результаты показали, что 45 пациентов (88,2%) имели IgE-сенсibilизацию к экстракту собаки. Была обнаружена статистически значимая корреляция между суммарными уровнями аллерген-специфических IgE к молекулам Can f 1 – Can f 6 и уровнями специфического IgE к экстракту собаки. Для оценки корреляции был использован коэффициент корреляции Пирсона ($R = 0,86$; $p < 0,0001$) (рисунок 7). 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.



Примечание: Коэффициент корреляции Пирсона (R) = 0,86; p < 0,0001

Рисунок 6 – Корреляция между суммой IgE-специфических антител к Can f 1 – Can f 6 и уровнем IgE к экстракту собаки

Сенсибилизация 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 сенсибилизации к аллергену Can f 5 было установлено на уровне 0,1 кЕДА/л. Когорта пациентов, сенсибилизированных к Can f 5, составила 71 пациента, из которых 85,9% были сенсибилизированы 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 8). 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.



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 7 – 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

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.

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 иммунокапов 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 сенсибилизации 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 сенсибилизации 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 сенсибилизацию к аллергенам. При диагностике аллергии на собаку рекомендуется использовать ImmunoCAP или другие молекулярные тесты на основе аллергокомпонентов, позволяющие дифференцировать сенсибилизацию 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 моносенсибилизации 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 аллeрготестирование на компоненты Can f 1 – Can f 6, чтобы определить индивидуальные риски и факторы сенсибилизации. В случае выявления сенсибилизации 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 аллeргенах собак.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Характеристика аллeргенов кошки / К. А. Рябова, **Е. М. Козлов**, Д. Р. Трифонова, А. Р. Галашин, А. Р. Левшина, А. А. Дубовец, А. В. Карсонова, И. В. Евсегнеева, А. В. Караулов, Р. Валента // Иммунология. – 2023. – Т. 44. – № 3. – С. 368-378. – DOI: 10.33029/0206-4952-2023-44-3-368-378.

2. Получение панели молекулярных аллeргенов 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, А. Р. Левшина, А. А. Дубовец, А. В. Караулов // Первый межрегиональный конгресс по аллeргологии и иммунологии : СБОРНИК ТЕЗИСОВ, Москва, 09 октября 2023 года. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "СМАРТ", 2023. – С. 23-24. – EDN ZPHMOP.

3. Сравнение данных по использованию аллeргочипов в практике для оценки профиля сенсибилизации в когортах / А. Р. Галашин, К. А. Рябова, А. Р. Левшина, А. А. Дубовец, **Е. М. Козлов**, А. В. Караулов // Первый межрегиональный конгресс по аллeргологии и иммунологии: СБОРНИК ТЕЗИСОВ, Москва, 09 октября 2023 года. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью "СМАРТ", 2023. – С. 12. – EDN JGQIVN.

4. Albumins represent highly cross-reactive animal allergens / Z. Liu, D. Trifonova, I. Tulaeva, K. Riabova, A. Karsonova, **E. Kozlov**, O. Elisyutina, M. Khaitov, M. Focke-Tejkl, T. Chen, A. Karaulov, R. Valenta // **Front Immunol.** – 2023. – № 14. – P. 1241518. – DOI: 10.3389/ fimmu.2023.1241518. [**Scopus, WoS, PubMed**]

5. Современная концепция молекулярной диагностики аллергии на собак / **Е. М. Козлов**, А. А. Дубовец, К. А. Рябова, А. Р. Галашин, А. Р. Левшина, А. В. Карсонова, А.

В. Караулов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – № 175(6). – С. 664-669. – DOI: 10.47056/0365-9615-2023-175-6-664-669.

6. 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, П. М. Соколов, А. В. Караулов, И. Р. Набиев, К. А. Рябова, А. А. Дубовец, А. М. Усанова; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 19 с.

7. Recombinant IgE-Reactive Functional Can f 5 Devoid of Cross-Reactive Carbohydrate Determinants / Е. Козлов, D. Trifonova, A. Dubovets, A. Usanova, I. Tulaeva, P. Gattinger, D. Fomina, W. Hemmer, N. Gorokhovets, R. Valenta, A. Karaulov // **Allergy**. – 2025. – Vol. 80. – № 6. – P. 1785-1789. – DOI: 10.1111/all.16465. [**Scopus, WoS, Pubmed**]

8. Аллергочипы в молекулярной диагностике: от когортной оценки к персонализированному ведению пациента / К. А. Рябова, Е. М. Козлов, Д. Р. Трифонова, А. Р. Галашин, А. А. Дубовец, О. А. Белик, А. Р. Левшина, И. В. Евсегнеева, А. В. Караулов // Российский биотерапевтический журнал. – 2025. – № 24(1). – С. 10-26. – DOI: 10.17650/1726-9784-2025-24-1-10-26.

9. 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, А. А. Дубовец, А. М. Винцевская, А. Д. Лукашевичус, А. А. Баскаков, Д. С. Фомина, И. В. Евсегнеева, А. В. Караулов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2025. – № 180(7). – С. 76-80. – DOI: 10.47056/0365-9615-2025-180-7-76-80.

10. Молекулярный профиль сенсibilизации к аллергенам собаки: диагностика с использованием «АллергочипРФ» / Е. М. Козлов, Д. Р. Трифонова, К. А. Рябова, А. А. Дубовец, А. М. Винцевская, А. Д. Лукашевичус, А. А. Баскаков, Д. С. Фомина, И. В. Евсегнеева, А. В. Караулов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2025. – № 1. – С. 59-67. – DOI: 10.14427/jipai.2025.1.59.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

E. coli — *Escherichia coli*;

ПААГ— электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия;

IgE — иммуноглобулин класса E;

IgG — иммуноглобулин класса G;

Can f — белки семейства *Canis Familiaris*;

ImmunoCAP — коммерческая диагностическая система для выявления специфических IgE;

АСИТ — аллерген-специфическая иммунотерапия.