

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*



Рябова Ксения Александровна

**Оценка клинической и диагностической значимости алергокомпонентов  
Fel d 1, Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 5, Fel d 6, Fel d 7, Fel d 8  
при аллергии на кошку**

3.2.7. Иммунология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**  
доктор медицинских наук, профессор,  
академик РАН  
Караулов Александр Викторович

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	16
1.1. Патогенетические аспекты аллергических заболеваний и IgE-ассоциированной гиперчувствительности .....	16
1.2. Значимость респираторных аллергенов, распространенность.....	17
1.3. Характеристика аллергенов кошки .....	20
1.3.1. Fel d 1.....	20
1.3.2. Fel d 2.....	22
1.3.3. Fel d 3.....	23
1.3.4. Fel d 4 и Fel d 7 .....	23
1.3.5. Fel d 5 и Fel d 6 .....	25
1.3.6. Fel d 8.....	25
1.4. Влияние окружающей среды на клинические проявления аллергических заболеваний .....	26
1.5. Перспективы использования рекомбинантных аллергенов .....	27
1.6. Перспективы использования рекомбинантных и пептидных аллергенов в аллерген-специфической иммунотерапии.....	30
1.6.1. Попытки создания пептидного аллерген-специфической иммунотерапии против аллергии на кошку .....	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	36
2.1. Характеристика пациентов.....	36
2.2. Реактивы, расходные материалы и оборудование.....	40
2.2.1. Реактивы.....	40
2.2.2. Расходные материалы .....	42
2.2.3. Оборудование .....	44
2.3. Экспрессия и очистка аллергенов .....	45
2.4. Оценка функциональной активности полученных аллергенов.....	47

2.5. Биотилинизация аллергенов.....	48
2.6. Количественное определение уровней аллерген-специфического IgE.....	50
2.7. Статистическая обработка результатов .....	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	52
3.1. Клиническая характеристика пациентов .....	52
3.2. Результаты оценки профиля сенсibilизации к аллергокомпонентам кошки.....	53
3.3. Уровни сенсibilизации к аллергокомпонентам кошки и их связь с симптомами.....	56
3.4. Связь симптомов и фенотипов аллергии на кошек с профилями распознавания молекулярных IgE и кумулятивными уровнями аллерген-специфических IgE .....	62
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	67
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	70
ВЫВОДЫ.....	72
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	73
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	74
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	80
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	92

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

По прогнозам Всемирной организации здравоохранения, к 2025 году половина населения Земли будет страдать аллергическими заболеваниями, в то время как сейчас клинические проявления гиперчувствительности наблюдаются у 20 % людей во всем мире [32]. Самые распространенные источники респираторных аллергенов на территории Российской Федерации – это пыльца сезонных растений и клещи домашней пыли. В один ряд по распространенности с этими аллергенами можно поставить эпителий, шерсть и другие антигены пушистых домашних животных [25]. Действительно, длительное наблюдение за населением развитых стран подтверждает значительное влияние кошек и собак как наиболее распространенных домашних животных на возрастание частоты аллергических заболеваний: чем выше встречаемость питомцев, тем чаще регистрируют различные клинические формы аллергий. Корреляция между аллергией на пушистых животных и респираторными формами аллергии имеет большое значение. Высокие эпидемиологические показатели обязывают практикующего врача обследовать всех пациентов с аллергическими заболеваниями дыхательных путей на предмет сенсibilизации к перхоти домашних животных. Преобладание сенсibilизации к нескольким животным встречается достаточно часто и может указывать на косенсibilизацию или перекрестную реактивность с другими антигенами. В некоторых странах сенсibilизацию к пушистым животным связывают с более тяжелым течением аллергических заболеваний, что создает дополнительную нагрузку на здравоохранение и расширяет спектр диагностических и терапевтических проблем [58].

Люди, страдающие респираторными формами аллергических заболеваний и имеющие сенсibilизацию к антигенам домашних животных, как правило характеризуются более тяжелым фенотипом астмы. Сенсibilизация и экспозиция аллергенов могут выступать в качестве факторов риска для предрасположенных к

аллергии пациентов. Возрастающая корреляция между воздействием аллергена и тяжестью заболевания определяется пролонгированием времени, которое население проводит дома; это особенно актуально после вынужденной профилактической изоляции вследствие пандемии COVID-19 [54]. Очевидное решение в вопросе уменьшения тяжести аллергических заболеваний или даже их полной ликвидации – исключение контакта с причинно-значимым аллергеном. Проблема воздействия компонентов среды в помещении оценивалась во многих работах, где особое внимание уделялось исходам астмы и определению клинически эффективных процедур элиминации аллергена [91]. Однако провести полноценный анализ с дальнейшим формированием систематических обзоров и включением полученных данных в клинические рекомендации достаточно затруднительно из-за выраженной неоднородности научных работ.

Трудность работы с людьми, подверженными аллергическим заболеваниям по причине сенсibilизации к домашним животным, определяется вариабельностью методов, которые применяют при выделении аллергенов и при оценке полученных результатов. Кроме того, важную роль играют экологические и географические особенности изучаемой популяции, поскольку эти факторы напрямую влияют на клинические характеристики, сезонность симптомов и степень тяжести аллергических заболеваний. Отличие в аллергенах из-за разных условий проживания и экологических факторов не позволяет с уверенностью переносить результаты исследований с одной популяции на другую, что существенно снижает воспроизводимость исходов. Эта особенность приводит к тому, что исследователи вынуждены изучать аллергены каждой конкретной местности и выявлять мажорные и минорные триггеры аллергических заболеваний, именно в этом случае данные, собранные в таких обособленных научных работах, будут релевантны.

Часто конечной целью исследователей становится минимизация контактов населения с потенциальными аллергенами. Эту стратегию ученые стараются реализовывать множеством различных способов, от простых вмешательств – проведение школ и курсов обучения, направленных на уменьшение контакта с аллергенами, – до более комплексных и многогранных программ [95].

Степень неоднородности дизайнов исследований, целью которых является изучение аллергенов и их распространенность, очень велика. Гетерогенность результатов не всегда позволяет обобщать выводы и переносить результаты одних исследований на иную популяцию и выравнивать эффективность мероприятий, направленных на охрану среды внутри помещений. Однако, опираясь на существующие источники, уверенно можно сказать, какие аллергены могут быть наиболее актуальными для конкретного пациента или группы людей, какие пациенты или сообщества будут с наибольшей вероятностью чувствительны к различным мероприятиям и вмешательствам, связанным с аллергенами, и какие вмешательства с наибольшей вероятностью приведут к клинически значимому снижению уровня целевого аллергена [36]. Согласно GA2LEN, сенсibilизация sIgE к домашним животным часто встречается у пациентов с ринитом в Европе, Северной Америке и Южной Америке. Частота встречаемости пациентов, сенсibilизированных к аллергенам кошки, составляет от 24,8 % до 27,9 %, к аллергенам собак – от 25,6 % до 28,8 %. Высокая чувствительность к sIgE домашних животных может быть объяснена увеличением контакта с кошками и собаками в домах, особенно в городских городах [7, 47]. Таким образом, вопрос ведения гипоаллергенного быта до конца не решен для всей группы данных аллергенов, в том числе и аллергенов кошки [36]. Наиболее эффективной долгосрочной стратегией восстановления окружающей среды у лиц, чувствительных к домашним животным, является изоляция чувствительных лиц от потенциальных аллергенов и, соответственно, элиминация домашних животных, ассоциированных с аллергией. Попытки обособить животное в отдельной комнате с целью минимизации контактов безрезультатны и малоэффективны. Это побуждает разработку новых методов борьбы с аллергенами и их воздействием на пациентов. До сих пор большая часть противоаллергической терапии базируется на симптоматическом лечении и применении в рутинной практике таких фармакологических групп, как антигистаминные препараты или препараты кромоглициевой кислоты. Однако научные исследования в области патофизиологических механизмов, которые реализуются при аллергической реакции, с каждым годом становятся все яснее, и появляются новые возможности

воздействовать не только на последствия гиперсенсibilизированного иммунного ответа, но и на этиопатогенетические звенья процесса.

IgE-ассоциированная аллергия на кошек – на один из самых агрессивных носителей аллергенов для жителей Центрального округа Российской Федерации (РФ) – представляет наибольший интерес и составляет важную часть практикующего врача-аллерголога. Широкая распространенность этой патологии приводит к необходимости создания аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) – прецизионного метода этиопатогенетического лечения [99]. Основным ограничением АСИТ является выделение белков, которые в дальнейшем лягут в основу вакцин или иных форм лекарственного препарата. Существует несколько аллергенов на кошку, что также значительно затрудняет создание АСИТ против аллергии на кошку, поэтому разработка профиля аллергенов этого домашнего животного представляют собой весьма актуальную проблему. Кроме того, выявление мажорных и минорных аллергенов позволит более таргетно и индивидуально влиять на сенсibilизацию пациентов, что позволит получить болезнь-модифицирующее действие терапии с исходом в ремиссию, в том числе стойкую, а не просто купировать симптомы гиперчувствительности.

### **Степень разработанности темы исследования**

Был проведен анализ уже имеющихся работ по направлению данной тематики.

#### Прототип.

1. IgE and IgG binding patterns and T-cell recognition of Fel d 1 and non-Fel d 1 cat allergens.
2. Hales BJ1, Chai LY2, Hazell L2, Elliot CE2, Stone S2, O'Neil SE2, Smith WA2, Thomas WR2.
3. Telethon Institute for Child Health Research and Centre for Child Health Research, University of Western Australia, Subiaco Wa, Australia. Electronic address: belinda@ichr.uwa.edu.au.
4. Telethon Institute for Child Health Research and Centre for Child Health

Research, University of Western Australia, Subiaco Wa, Australia.

В проведенном исследовании проводилась оценка потенциально аллергенных эпитопов аллергокомпонентов Fel d 1, 2, 3, 4, 7, 8 в двух группах пациентов, с аллергией на кошку и без оной. В дальнейшем полученные результаты противопоставлялись реактивности Fel d 1 как наиболее агрессивному аллергену.

Несмотря на то, что в данной работе была проведена оценка реактивности указанных аллергокомпонентов, иные характеристики, а также связь с симптоматикой и тяжестью течения аллергопатологии проведена не была. Также не проводилась оценка Fel d 5–6.

### 1. Аналог.

Evolution of IgE responses to multiple allergen components throughout childhood.

Howard R<sup>1</sup>, Belgrave D<sup>2</sup>, Papastamoulis P<sup>1</sup>, Simpson A<sup>3</sup>, Rattray M<sup>1</sup>, Custovic A<sup>4</sup>.

В исследовании оценивалась реактивность аллергенов посредством использования аллергочипа на 112 аллергенов, в когорте пациентов в течение детского возраста был произведен анализ по связи распространенности, симптомов, а также тяжести течения аллергопатологии с превалирующими аллергенами. Также рассматривались не аллергокомпоненты в отдельности, а так называемые «кластеры», когда аллергены были скомпонованы по группам.

### 2. Аналог.

Басс, Е. А. Роль экспозиции основных аллергенов кошки (Fel d 1, Fel d 2, Fel d 4) в сенсibiliзирующем профиле и тяжести течения аллергического ринита у детей

// Басс Евгения Ароновна: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. – Екатеринбург, 2019.

---

<sup>1</sup> Division of Informatics, Imaging and Data Sciences, Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Manchester, United Kingdom.

<sup>2</sup> Section of Paediatrics, Department of Medicine, Imperial College London, London, United Kingdom.

<sup>3</sup> Division of Infection, Immunity and Respiratory Medicine, University of Manchester and University Hospital of South Manchester, Manchester Academic Health Sciences Centre, Manchester, United Kingdom.

<sup>4</sup> Section of Paediatrics, Department of Medicine, Imperial College London, London, United Kingdom. Electronic address: a.custovic@imperial.ac.uk.

Работа выполнена на базе Государственного автономного учреждения здравоохранения Свердловской области Областной детской клинической больницы (г. Екатеринбург) и Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии УрО РАН (г. Екатеринбург). Исследование проводилось с участием 228 детей с установленным диагнозом «аллергический ринит», использовались клинико-анамнестические, инструментально-диагностические, лабораторные иммунологические методы исследования.

Работа представляет в первую очередь клиническую значимость, использованы только коммерчески доступные аллергокомпоненты.

### **Цель и задачи исследования**

Цель исследования: оценить профили сенсibilизации к аллергокомпонентам кошки с выделением клинически значимых молекул.

Задачи исследования:

1. Экспрессия аллергокомпонентов, недоступных в коммерческом производстве (Fel d 3, Fel d 4, Fel d 7, Fel d 8, на культуре E.Coli GOLD).
2. Выделение полученных аллергокомпонентов.
3. Оценка функциональной активности полученных аллергокомпонентов (ELISA).
4. Формирование когорты пациентов на базе банка сывороток лаборатории Иммунопатологии Института молекулярной медицины.
5. Оценка уровня специфических IgE к Fel d 1, Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 6, Fel d 7, Fel d 8 (Immuposar с использованием протокола биолитинизации).
6. Статистическая обработка результатов (SPSS).

## Научная новизна

По данным Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии, каждый пятый европеец

страдает той или иной формой аллергии [41]. В России, согласно ежегодным докладам Института иммунологии, таких от 17 до 34 процентов [50]. По прогнозам Всемирной организации здравоохранения, к 2025 году аллергиками станет почти половина населения Земли [10, 69]. Опираясь на эти эпидемиологические показатели и прогнозы, можно с уверенностью сказать, что роль аллергических заболеваний будет занимать более значимую часть рутинной практики врачей. Если говорить о конкретных нозологиях, то аллергия на кошек распространена повсеместно. Наблюдается положительная тенденция по количеству новых диагностированных случаев. Для населения РФ аллергены кошек одни из самых клинически значимых. Сенсибилизация может проявляться различными симптомами, от самых легких форм до тяжелых и даже летальных. Согласно международным исследованиям, в России аллергией на кошек страдают 50% детей, причем у некоторых могут развиваться опасные симптомы, вплоть до астмы и летальных исходов [83].

Реакция на кошачьи аллергены проявляется как ринит (воспаление слизистой носа), конъюнктивит (воспаление слизистой глаз) и астматический бронхит с кашлем и затрудненным дыханием. Хорошо известно, что повышенные уровни IgE к аллергенам животных связаны с симптомами аллергии. В настоящее время к триггерам, способствующим ухудшению прогноза по аллергопатологии, относят не только факт проживания пациентов с аллергией на кошек с кошками, но и контакт с данными аллергенами в публичных местах в виде шерсти, перхоти и белковых соединений, переносимых на одежде владельцев кошек.

В настоящий момент известно о аллергокомпонентах аллергена кошки: Fel d 1, Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 6, Fel d 7, Fel d 8 [68]. Однако в публикациях, связанных с клиническими симптомами аллергии на кошку, описываются в основном только Fel d 1, встречается несколько публикаций, в которых были

описаны биохимические характеристики всех коммерчески доступных аллергокомпонентов, а именно Fel d 1, Fel d 2, Fel d 4, Fel d 7 и Fel d 8 [68, 83]. Остальные публикации посвящены описанию только одного аллергокомпонента в рамках изолированного синдрома или описания особенностей структуры аллергокомпонента [45].

Таким образом, впервые описана распространенность вышеперечисленных аллергокомпонентов в едином аллергологическом профиле. Впервые дана оценка их функциональной и клинической активности, что в дальнейшем позволит использовать эти данные как с диагностической, так и с терапевтической целями.

Согласно проведенному поиску с использованием сети INTERNET по следующим базам публикаций и исследований PubMed, BioMED CENTRAL, Web of SCIENCE, Scopus, исследований и публикаций по данной теме в представленном объеме найдено не было.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Благодаря проведенной оценке реактивности аллергенов посредством использования аллергочипов, была разработана серологическая характеристика пациентов, которая может быть использована в последующих исследованиях. Составлена характеристика значимых аллергокомпонентов. Проведена оценка перекрестной реактивности сенсibilизированных пациентов к другим аллергенам, помимо кошачьих, что позволит предугадывать клинические проявления при возможных контактах с потенциальными триггерами. Проанализированы уровень sIgE у пациентов с разными видами задействованного аллергена кошки. Определены особенности клинических проявлений (бронхиальная астма, ринит, кожные проявления) в зависимости от сенсibilизации пациентов к Fel d 1, Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 6, Fel d 7, Fel d 8. Данная работа представляет клиническую значимость, поскольку полученные результаты и их дальнейшее внедрение в учебную практику благоприятно отразятся на переходе к персонализированному подходу в диагностике и лечении аллергопатологии. Использование молекулярных методов позволит решить проблему кросс-реактивности при диагностике

причинно-значимой сенсibilизации, а использование данных методов для разработки АСИТ позволит решить проблему стандартизации и контаминации препаратов, а значит, повысит эффективность проводимой терапии и исключит явления первичной сенсibilизации к белкам, контаминировавшим раствор, как мы это наблюдаем с водно-солевыми формами аллергенов. Соответственно, полученные данные составят основу дальнейших разработок в области аллерген-специфической терапии против аллергии на кошек, что очень значимо как для взрослой, так и для детской популяции Центрального округа России.

### **Методология и методы исследования**

Работа выполнялась на основе аналогов, приведенных в пункте «Степень разработанности темы исследования» с дополнениями, которые касаются особенностей аллергенов кошки. В приведенном диссертационном исследовании использованы следующие методики:

- экспрессия белков на культуре E.Coli BL 21 GOLD
- выделение полученных белков с использованием Ni-NTA
- ELISA
- ImmunoCap с использованием протокола биотинилизации
- SPSS 11.5 for Windows

### **Личный вклад автора**

Автором лично проведено планирование работы и определение методики исследования. Был осуществлен поиск и анализ литературы по проблеме диссертации на базе различных источников, включая отечественные и иностранные базы данных. Автор произвел набор больных, а также организовал их обследование, что послужило основанием включения пациентов в исследования с учетом ранее составленных критериев. После набора необходимого количества пациентов автором была сформирована база данных и статистическая обработка полученной информации. Автор принимал активное участие непосредственно в

проведении всех необходимых лабораторных анализов с учетом ранее составленных протоколов. Итоговый анализ результатов также осуществлялся автором с помощью SPSS Statistics версии 15.0 и Graphpad Prism версии 6.0.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Несмотря на то, что длительное время единственным мажорным аллергокомпонентом аллергена кошки считался Fel d 1, наше исследование показало, что в выбранной популяции также распространены Fel d 4 и Fel d 7.

2. Выявлена прямая взаимосвязь между количеством симптомов и количеством аллергокомпонентов, к которым имела сенсibilизация.

3. Наша работа продемонстрировала, что использование молекулярных методов диагностики с использованием всей панели аллергокомпонентов имеет более высокую информативность и специфичность.

### **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.

Выполнена работа соответствует следующим направлениям исследования:

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

В данной работе проведена когортная оценка реакций гиперчувствительности на аллергокомпоненты аллергена кошки.

2. Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии. В данной работе проведена когортная оценка IgE-опосредованной реакции на аллергены кошки.

3. Изучение патогенеза иммуноопосредованных (аллергии, первичные и вторичные иммунодефициты, аутоиммунные болезни) и других заболеваний. В данной работе проведена оценка и анализ связи симптомов аллергии на кошку с сенсibilизацией к разным аллергокомпонентам кошки.

4. Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов. Полученные результаты исследования можно использовать для создания нового поколения АСИТ, обладающей высоким профилем эффективности и безопасности, а так высокочувствительных диагностических систем. Однако данная разработка требует дальнейших исследований, в основу которых пойдут результаты настоящей диссертационной работы

5. Разработка способов воздействия на иммунную систему с помощью фармакологических препаратов и методов иммунобиотерапии. Исследование эффективности и безопасности этих воздействий.

Полученные результаты исследования можно использовать для создания нового поколения АСИТ, обладающей высоким профилем эффективности и безопасности, а так высокочувствительных диагностических систем. Однако данная разработка требует дальнейших исследований, в основу которых пойдут результаты настоящей диссертационной работы.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

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

Работа выполнена на кафедре клинической иммунологии и аллергологии факультета послевузовского профессионального образования врачей ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский

Университет). Апробация диссертационной работы состоялась 15 января 2024 г. на научно-практической конференции кафедры клинической иммунологии и аллергологии факультета послевузовского профессионального образования врачей ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на профессиональных международных конгрессах:

– 17-й Конгресс Международного союза иммунологических обществ (IUIS) (Пекин, Китай). Конгресс IUIS 2019, в котором приняли участие более 6500 делегатов, подтвердил свой статус самого важного глобального собрания иммунологов. Было представлено два постерных доклада;

– Европейский конгресс по иммунологии – ECI2021 (гибридный формат), основной доклад в рамках сессии, посвященной генно-инженерным методам в аллергологии.

### **Публикации по теме диссертации**

Всего по результатам исследования опубликовано 13 научных работ, в том числе 10 научных статей в издании, индексируемом в международной базе Scopus; 3 иных публикации по теме научной работы.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 96 страницах машинописного текста, состоит из введения, глав обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Содержание работы иллюстрировано 9 рисунками и 4 таблицами. Список литературы включает 5 отечественных и 105 зарубежных работ.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Патогенетические аспекты аллергических заболеваний и IgE- ассоциированной гиперчувствительности

Гиперчувствительность 1-го типа (ГП-1) представляет собой реакцию немедленного типа и характеризуется синтезом и секрецией иммуноглобулинов E (IgE) против растворимого в плазме антигена [4, 92]. ГП-1 включает atopические заболевания, которые представляют собой усиленные IgE-опосредованные иммунные реакции (астма, ринит, конъюнктивит и дерматит), и аллергические заболевания, которые являются иммунными реакциями на чужеродные антигены (анафилаксия, крапивница, ангионевротический отек, пищевая и лекарственная аллергия). Аллергены, вызывающие ГП-1, могут не представлять никакой угрозы для жизни человека (пыльца, клещи, пищевые продукты, лекарства и т. д.) или могут быть опасными, как в случае с ядами насекомых [59]. Клинически ГП-1 может затрагивать разные ткани и системы органов, но чаще всего она реализуется в виде следующих нозологий [101]:

- аллергический ринит;
- аллергический конъюнктивит, потенциально вызванный сезонными аллергенами, такими как пыльца или споры плесени;
- дерматологическая крапивница, atopическая экзема или эритема;
- ангионевротический отек;
- бронхиальная астма;
- системная реакция, представляющая угрозу для жизни и требующая неотложной медицинской помощи, известная также как анафилаксия.

Существуют определенные факторы риска, повышающие вероятность развития аллергических заболеваний [77]. Среди ключевых факторов выделяют географические особенности, экологические условия, такие как загрязнение или социально-экономический статус населения, генетическую предрасположенность и «гигиеническую гипотезу». «Гигиеническая гипотеза» предполагает, что

соблюдение правил гигиены в современном обществе и отсутствие раннего контакта со многими микробами или антигенами могут привести к сбоям в функционировании иммунной системы [96]. Таким образом, гипотеза предполагает, что раннее воздействие широкого спектра микроорганизмов и антигенов может фактически привести к общему снижению частоты аллергии. В современных условиях, направленных на дезинфекцию, асептику и антисептику, вопрос IgE-ассоциированной ГП-1 становится все более актуальным, поскольку распространенность аллергических заболеваний продолжает расти обратно пропорционально показателям урбанизации населения.

## **1.2. Значимость респираторных аллергенов, распространенность**

Распространенность аллергических заболеваний с каждым годом возрастает, вследствие чего аллергология как клиническая дисциплина все глубже внедряется в практическую деятельность врача [22]. Частота аллергических заболеваний в мире варьирует от 10 % до 40 % [74]. Похожие данные демонстрирует Институт иммунологии ФМБА: частота аллергических заболеваний в российской популяции колеблется от 17,5 % до 30 % [82]. Важную роль в выраженности клинических проявлений гиперсенсibilизации играет природа аллергена, которая в свою очередь зависит от климата, географических и экологических условий каждого отдельного региона. Также к факторам, влияющим на тяжесть симптомов аллергических заболеваний, относят индивидуальные особенности человека, уровень сенсibilизации (количество продуцируемого аллерген-специфического IgE), длительность воздействия аллергена [15, 16, 27, 84, 105]. Активность аллергенов является важным фактором риска развития сенсibilизации и респираторных аллергических заболеваний, таких как астма и риноконъюнктивит. Самые распространенные источники респираторных аллергенов на территории РФ – это пыльца сезонных растений и клещи домашней пыли. В один ряд по распространенности с этими аллергенами можно поставить эпителий, шерсть и другие антигены пушистых домашних животных. Среди наиболее агрессивных аллергенов для населения Центрального округа России выделяют шерсть

домашней кошки [49]. По данным мировой статистики, домашние кошки занимают второе место по причине развития респираторных форм аллергических заболеваний среди всех аллергенов, уступая лишь пыльце и клещам домашней пыли [87]. Кошки – одни из самых популярных домашних животных, контакт с которыми приводит к длительному воздействию на человека молекул, содержащихся в их шерсти и биологических жидкостях. Ввиду высокой популярности этих домашних животных растет распространенность сенсibilизации к ним, что в свою очередь увеличивает долю аллергических заболеваний, включая жизнеугрожающие состояния. Возрастающая заболеваемость лиц молодого и трудоспособного возраста значительно снижает качество жизни населения и таким образом создает серьезную дополнительную нагрузку на систему здравоохранения [5].

Воздействию аллергенов кошки подвержены люди разных возрастных категорий. При этом важно отметить, что наличие кошки в доме – необязательное условие манифестации аллергии. Люди, которые не контактируют напрямую с этим домашним животным, могут быть подвержены воздействию кошачьих аллергенов в местах повышенного скопления людей [110]. Чем больше контактов друг с другом, тем выше вероятность наличия кошки у кого-то из них. Из этого следует, что объединение детей в детских садах и школах приводит к накоплению аллергенов в классах и повышает риск развития аллергических заболеваний. Дети, в чьих семьях кошки не было, контактируют с шерстью и биологическими жидкостями животного, которые содержатся на одежде тех, кто завел домашнего питомца [109]. Это наблюдение подчеркивает, что даже при отсутствии прямого контакта с носителями аллергена экспозиция триггерных молекул в местах большого количества людей может способствовать манифестации аллергических реакций. Спектр клинических проявлений у сенсibilизированных пациентов широкий и включает риноконъюнктивит, бронхиальную астму, кожные проявления различной степени тяжести [16, 21, 25, 40, 88, 110], однако стоит отметить, что аллергены кошки по-разному реализуют клиническую картину. Вариативность симптомов, обусловленная разницей между «агрессивностью» аллергенов, создает потребность в определении точной природы

гиперчувствительности на кошку персонализировано для каждого пациента. Фундаментом для аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) как наиболее эффективного и безопасного метода является оценка индивидуального аллергологического профиля пациентов с полным описанием каждого отдельного аллергена кошек и с выделением наиболее распространенных и агрессивных. Оценка эффективности и обоснованности терапии для людей с аллергией на кошку для дальнейшего более таргетного лечения возможно только в случае точной молекулярной диагностики, что затруднительно при использовании нативных аллергенов.

Выходом из сложившейся ситуации могут служить диагностические аллергологические чипы [64]. Среди их преимуществ выделяют высокую чувствительность, измерение IgE и IgG к большому числу различных молекул, отсутствие необходимости в больших объемах сыворотки крови, более высокая клиническая значимость результатов по сравнению с серологическими исследованиями [Lurinek и др., 2014]. В качестве примера можно привести чипы ImmunoCAP ISAC и MeDALL. Первый использовался на протяжении нескольких лет в разных клинических и эпидемиологических исследованиях, однако у него имеется ряд недостатков: на чипе расположены 112 аллергенов, что меньше по сравнению с другими аллергочипами; при низком уровне IgE к некоторым аллергенам чип недостаточно чувствителен [43, 46]. MeDALL – улучшенная версия ImmunoCAP ISAC за счет большего содержания аллергенов на чипе (170 аллергенов) и более высокой чувствительности теста [63]. Внедрение чипов с очищенными аллергенами домашней кошки в реальную практику позволило бы минимизировать недостатки АСИТ, среди которых выделяют низкое качество нативных экстрактов при диагностике этиологии аллергии, что в свою очередь приводит к недостаточной эффективности таргетной терапии. Кроме того, у пациентов возможно развитие полисенсibilизации, в том числе гиперчувствительность на несколько кошачьих аллергенов, что делает вопрос о разработке чипов с очищенными белками еще более актуальным. В настоящее время Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и Международным союзом иммунологических обществ (IUIS) признано 8 аллергенов кошки, которые

имеют практическую значимость и способны вызывать IgE-опосредованный иммунный ответ. Аллергены, а также их биологическая роль и молекулярная масса представлены в таблице 1. Опираясь на данные проведенных исследований, слюна, сальные и перианальные железы – основные источники антигенной нагрузки. Наиболее изученные аллергены – Fel d 1, Fel d 2, Fel d 4, Fel d 7, в то время как функции и аллергологическая активность других молекул продолжают активно изучаться.

Таблица 1 – Аллергены кошки и их свойства [16, 18, 27, 37, 66, 97]

Аллерген	Распространенность, (%)	Семейство белков	Молекулярная масса белка, кДА	Основной источник
<b>Fel d 1</b>	95–96	Секретоглобулин	38	Перхоть, слюна
<b>Fel d 2</b>	0,8–7	Сывороточный альбумин	69	Перхоть, сыворотка, моча
<b>Fel d 3</b>	10	Цистатин А	11	Перхоть
<b>Fel d 4</b>	63	Липокалин	22	Слюна
<b>Fel d 5</b>	38	IgA	400	Слюна, сыворотка
<b>Fel d 6</b>	-	IgM	800-1000	Слюна сыворотка
<b>Fel d 7</b>	37	Липокалин	17,5	Слюна
<b>Fel d 8</b>	19	Латерин-подобный	24	Слюна

### 1.3. Характеристика аллергенов кошки

#### 1.3.1. Fel d 1

По распространенности среди аллергенов домашней кошки лидирует Fel d 1 – секретоглобулин массой 38 кДА. Fel d 1 был одним из первых аллергенов, для которых удалось определить ДНК- и полную аминокислотную последовательность [17]. Рекомбинантный Fel d 1, схожий по своим свойствам с природным аллергеном, был получен путем экспрессии обеих цепей в составе одного рекомбинантного белка [18]. Биологическая функция этого белка в физиологии

кошачьего организма до сих пор неясна. Предполагается, что он участвует в защите кожи и слизистых оболочек животного [13]. Кошки практически любой породы являются носителями этого аллергена, при этом самцы секретируют больше Fel d 1 по сравнению с самками. Благодаря своим биохимическим свойствам, Fel d 1 достаточно устойчив во внешней среде и может продолжительное время находиться в помещениях и даже в общественном транспорте независимо от наличия домашнего животного [79].

На долю Fel d 1 приходится 95–96 % всех случаев аллергии на кошку [97]. Гиперчувствительностью к этому аллергену могут обладать как дети, так и взрослые. Дети с аллергией на кошек имеют более высокие уровни IgE к rFel d 1 и более высокие уровни общего IgE по сравнению со взрослыми [42]. Ученые это связывают с менее активным иммунным ответом во взрослом организме, поскольку с возрастом подавляется продукция IgE.

В исследованиях, где изучалось влияние различных факторов на развитие и течение бронхиальной астмы, сенсibilизацию к Fel d 1 обнаружили в 10 % в группе из 202 взрослых пациентов с клиническими проявлениями бронхиальной обструкции [44]. В другом исследовании это число достигало 50 % пациентов в изучаемой группе [42]. С точки зрения возрастных особенностей в контексте клинической картины уровень IgE к rFel d 1 в группе детей с астмой или риноконъюнктивитом был значительно выше по сравнению со взрослой группой. Как следует из исследования, дети с клинической картиной бронхиальной астмы имели более высокие уровни rFel d 1-специфического IgE по сравнению с детьми, страдающими только риноконъюнктивитом. В исследовании BAMSE/MeDALL было обнаружено, что есть корреляция между наличием Fel d 1-ассоциированных IgE в детстве и манифестацией аллергических реакций в подростковом возрасте [83]. Важным выводом стало то, что сенсibilизация к отдельному Fel d 1 в детстве и полисенсibilизация к кошачьим аллергенным молекулам предсказывают аллергию кошек в продольном и поперечном разрезах значительно лучше, чем IgE к нативному экстракту шерсти животного.

В исследовании Asarnoj et al. было продемонстрировано, что полисенсibilизация (то есть сенсibilизация к  $\geq 3$  молекулам аллергена кошки)

детей в возрасте 4 и 8 лет была более точным предиктором манифестации аллергических заболеваний в подростковом возрасте, чем сенсibilизация к нативному экстракту кошки. Высокий уровень IgE именно к Fel d 1 был наиболее чувствительным показателем прогноза аллергии у детей в возрасте 16 лет. Интересным выводом исследования BAMSE/MeDALL стало фенотипическое различие между пациентами с моно- и полисенсibilизацией к одному или нескольким аллергенам кошки соответственно. Эти результаты доказывают преимущества молекулярной диагностики IgE-ассоциированного аллергена у каждого пациента с аллергией на кошку.

### 1.3.2. Fel d 2

Белок Fel d 2 представляет собой сывороточный альбумин кошки с молекулярной массой 69 кДа. Его можно обнаружить в перхоти, сыворотке крови и моче домашнего животного. По молекулярной структуре сывороточный альбумин представляет собой крупный глобулярный негликозилированный белок с  $\alpha$ -спиральной структурой, стабилизированной дисульфидными мостиками. Он синтезируется в печени и, являясь основным белковым компонентом плазмы, выполняет транспортную функцию и регулирует коллоидно-осмотическое давление. Аминокислотная последовательность Fel d 2 примерно на 75–85 % совпадает с белками других млекопитающих, таких как Can f 3 собаки, Sus s 1 свиньи, Bos d 6 крупного рогатого скота и Equ c 3 лошади [68]. Распространенность у Fel d 2 намного ниже по сравнению с Fel d 1 и по разным источникам составляет 0,8–7 % [19, 25]. В исследовании Suzuki и др. (2019) авторы обнаружили возможные перекрестные реакции между аллергенами: те, кто был сенсibilизирован к Fel d 2 и Fel d 4, с большей вероятностью были сенсibilизированы к Fel d 1, но не наоборот. Высокую перекрестную активность Fel d 2 подтверждает еще тот факт, что именно его связывают с синдромом кошка–свинина – пищевой аллергией на мясо свиньи у людей, сенсibilизированных к Fel d 2 [12, 65, 85]. Примечательно, что IgE-реактивность к рекомбинантному кошачьему альбумину проявляли в большей степени те пациенты, которые страдали атопическим дерматитом в

отличие от людей с аллергическим риноконъюнктивитом [24].

### 1.3.3. Fel d 3

Цистатин Fel d 3, минорный аллерген домашней кошки, встречается в 10 % случаев гиперчувствительности к этому животному [89]. Он принадлежит к надсемейству цистатиновых ингибиторов цистеиновых протеаз (CPI). Это небольшой кислый белок без остатков цистеина или дисульфидных связей. Основная функция Fel d 3 – ингибирование цистеиновых протеаз, участвующих в деградации внутриклеточных белков [67]. IgE-реактивные цистатины были также идентифицированы в плодах киви *Actinidia deliciosa* (Act d 4), пыльце сорняков *Ambrosia artemisiifolia* (Amb a CPI) и паразитической нематоды *Anisakis simplex* (Ani s 4). Сходство последовательностей между обнаруженными белками Act d 4 и Fel d 3 – 13 %, между Act d 4 и Ani s 4 – 27 %, между Act d 4 и Amb a CPI – 40 % [Popovic и др., 2010].

### 1.3.4. Fel d 4 и Fel d 7

Fel d 4 и Fel d 7 – аллергены, которые относятся к липокалинам – небольшим по молекулярной массе межклеточным белкам, основной функцией которых является транспортировка гидрофобных молекул, таких как витамины и стероидные гормоны [51]. Помимо этого, при определенных обстоятельствах они могут связываться со специфическими рецепторами клеточной поверхности, а также образовывать макромолекулярные комплексы [37]. В исследовании Brewer et al было показано, что малые липидные частицы могут служить адъювантом для Th2-клеток [62]. В другом исследовании были обнаружены, что при взаимодействии Th2-клеток и белков Fel d 4 и Fel d 7 выделялись различные цитокины [47]. Эти факты свидетельствуют о том, что липид-связывающая способность липокалинов может служить фактором, который способствует запуску аллергических реакций.

Fel d 4 – второй по распространенности аллерген среди людей,

сенсibilизированных к кошке: специфические IgE-антитела к этому белку были выявлены до 63 % пациентов, имеющих аллергию на кошек [37, 68]. Важно отметить, что у большинства детей с сенсibilизацией к Fel d 4 были обнаружены IgE к Fel d 1, однако это правило не работает наоборот [20]. Аллергическая реакция на Fel d 4 может включать в себя симптомы бронхиальной астмы, однако у людей с высоким уровнем Fel d 4-ассоциированного IgE часто наблюдаются кожные проявления аллергии. Fel d 4 содержится главным образом в слюне, где его концентрация значительно превышает аналогичный показатель Fel d 1. Размер кошачьей шерсти не коррелирует с уровнем Fel d 4 в слюне, при этом максимальная концентрация этого аллергена была обнаружена у стерилизованных кошек [38, 76]. Аллерген Fel d 7 вырабатывается секреторными железами и содержится преимущественно в слюне, а также в секрете потовых и сальных желез кошки. Положительная реакция на Fel d 7 была обнаружена по разным оценкам от 22 % до 46 % у лиц с аллергией на кошек [47, 93, 104, 106]. Аллергия на этот белок может вызывать симптомы респираторной аллергии: одышку, ринорею, зуд в носу, слезотечение. У 40 % пациентов с аллергическим риноконъюнктивитом и/или бронхиальной астмой были обнаружены Fel d 7-ассоциированные IgE [47].

Степень гомологичности между липокалинами составляет, как правило, 10–20 %. Однако на этом фоне выделяются Fel d 4 и Fel d 7, у которых гомологичность к отдельным белкам в несколько раз больше. Так, Fel d 4 гомологичен собачьему белку Can f 6 на 67,4 % и главному лошадиному аллергену Equ c 1 на 64,2% [26, 29]. Fel d 7 на 63 % гомологичен белку Can f 1 [104]. За счет этого у некоторых пациентов с аллергией на кошек наблюдается перекрестная аллергия к собаке, как в случае с Fel d 4 и Fel d 7, или лошади, как в случае с Fel d 7. Это наблюдение подтверждается в том числе лабораторными исследованиями. У 92 % пациентов с аллергией на кошек, у которых были обнаружены IgE-антитела, выявляются IgE-антитела к Can f 1 [104].

При помощи перекрестно реагирующей антисыворотки было установлено, что белки Can f 1 и Fel d 7 имеют похожую структуру и обладают общими эпитопами [93].

### 1.3.5. Fel d 5 и Fel d 6

По структуре Fel d 5 и Fel d 6 представляют собой кошачьи иммуноглобулины IgA и IgM [23, 42]. Их можно обнаружить в больших количествах в слюне, сыворотке и в экстрактах кошачьей перхоти. Иммуный ответ человека, сенсibilизированного к иммуноглобулинам кошки, реализуется за счет выработки человеческих антител, направленных против углеводного участка IgM и IgA кошек – галактоза- $\alpha$ -1,3-галактоза ( $\alpha$ -Gal).  $\alpha$ -Gal представляет собой основной IgE-связывающий углеводный эпитоп в структуре кошачьих антител [30]. Именно с  $\alpha$ -Gal связывают аллергическую реакцию при употреблении мясных продуктов [103]. Специфические IgE к Fel d 5 и Fel d 6 могут обнаруживаться у пациентов с аллергией на кошку, но при этом отсутствует достоверная связь между уровнями антител и клиническими проявлениями аллергии (ринит, бронхиальная астма).

У 40 % европейцев, сенсibilизированных к домашней кошке, при проведении молекулярно-диагностических тестов обнаруживают гликозилированный компонент аллергена nFel d 5. IgE пациентов имели большее сродство к  $\alpha$ -Gal по сравнению со сродством к целому Fel d 5, что объясняется меньшим количеством эпитопов  $\alpha$ -Gal в структуре нативного Fel d 5 [55].

### 1.3.6. Fel d 8

Аллерген Fel d 8 содержится в слюне домашней кошки. Он относится к латерин-подобным белкам. Латерины по своей активности подобны сурфактанту – эти молекулы выстилают поверхность кожи животного, однако свою защитную функцию латерины реализуют без липидной фазы [104].

Антитела к Fel d 8 были выявлены в 28 % случаев пациентов с аллергией на кошку [21]. Fel d 8 имеет схожую аминокислотную последовательность с главными аллергенами лошадей: Equ c 4 и Equ c 5.

## **1.4. Влияние окружающей среды на клинические проявления аллергических заболеваний**

За последние несколько десятилетий были достигнуты значительные успехи в изучении аллергенов, их экспозиции в помещении и, главное, их влиянии на здоровье человека, в частности на систему органов дыхания. Эпидемиологические исследования подтвердили, что люди с астмой и с сенсibilизацией к различным аллергенам, находящимся в доме, как правило, имеют более тяжелый фенотип астмы: сенсibilизация и экспозиция аллергенов в этом случае могут быть движущим фактором прогрессирования заболевания. В связи с активным процессом урбанизации современное общество проводит больше времени в помещении, делая корреляцию между воздействием аллергенов и тяжестью заболевания все более актуальной. Изоляция, времяпрепровождение дома, карантинные мероприятия привели к невозможности реализовать первый постулат лечения аллергии – исключение контакта с причинно-значимым аллергеном. Во многих исследованиях оценивалось воздействие различных аллергенов помещения с целью изучения их воздействия на клинические проявления аллергии у человека. Однако точный анализ результатов исследований по вмешательству в домашнюю среду с целью элиминации аллергена затруднен из-за неоднородности этих типов исследований.

Исследования подобных вмешательств адаптированы к конкретным группам населения и предназначены для оценки конкретных вмешательств. Поскольку клиническая значимость аллергена варьирует в зависимости от экологии, географии и жилищных условий, результаты для одной исследуемой группы могут не воспроизводиться в другой географически или экологически отличной популяции. Дизайны проанализированных исследований включают в себя как простые и легко воспроизводимые методы (например, единичные вмешательства или просто обучение участников тому, как можно уменьшить количество аллергенов), так и многогранные комплексные вмешательства, направленные на большое количество аллергенов в условиях замкнутого помещения с обучением

пациентов и предоставлением подробной информации об аллергенах. Несмотря на то что высокая степень неоднородности в дизайнах исследований затрудняет делать общие выводы об эффективности мероприятий по охране окружающей среды внутри помещений, полученные данные можно назвать информативными для понимания, какие аллергены могут быть наиболее актуальными для пациента, а какие вмешательства с наибольшей вероятностью приведут к клинически значимому снижению уровня целевого аллергена [11].

Аллергия на пушистых животных, в частности кошек и собак, считается основным фактором риска развития бронхиальной астмы и ринита. Распространенность аллергии на пушистых животных прямо пропорциональна аллергическим заболеваниям дыхательных путей. Воздействие аллергенов от этих животных наблюдается повсеместно, и клиницист должен обследовать всех пациентов с аллергическим заболеванием дыхательных путей на предмет сенсibilизации к перхоти животных. Для многих пациентов характерна аллергическая полисенсibilизация, то есть гиперчувствительность к нескольким животным, что может указывать на перекрестную реактивность антител. В некоторых странах сенсibilизация к пушистым животным связывается с более тяжелым течением аллергических заболеваний, что создает дополнительные диагностические и терапевтические проблемы [16]. Атопия к аллергенам домашних животных считается важным фактором риска респираторных аллергических заболеваний. Согласно GA2LEN, сенсibilизация sIgE к домашним животным, особенно кошкам (от 24,8 % до 27,9 %) и собакам (от 25,6 % до 28,8 %), очень часто встречается у пациентов с ринитом в Европе, Северной Америке и Южной Америке. Высокая чувствительность к sIgE домашних животных может быть объяснена увеличением контакта с кошками и собаками в домах, особенно в городских условиях [3, 7].

### **1.5. Перспективы использования рекомбинантных аллергенов**

За последние два десятилетия значительный прогресс в биохимии и молекулярной биологии позволил охарактеризовать, наладить клонирование и производство соответствующих белковых компонентов аллергена и пептидов,

эмулирующих эпитопы, что позволило обнаруживать и количественно определять антитела sIgE к этим белкам или последовательным эпитопам. Первым компонентом, который был идентифицирован и клонирован, был мажорный аллерген Der p 1 клеща домашней пыли (*Dermatophagoides pteronyssinus*) [33].

Стандартизация аллергенов – это процесс разработки стандартного образца аллергена, который может быть использован для диагностики и лечения аллергических реакций. В процессе стандартизации аллергена проводятся тщательные исследования, направленные на определение его свойств и качества. В результате создается образец аллергена, который имеет определенную концентрацию и специфичность, что позволяет использовать его для точной диагностики аллергии и проведения иммунотерапии.

Существует несколько проблем со стандартизацией аллергенов:

1. На данный момент не для всех аллергенов существуют стандартизированные препараты. Некоторые аллергены могут быть трудными для выделения и очистки, особенно если они представлены в малых количествах в природе. Также может быть трудно различать аллергенные компоненты от неаллергенных в смесях.

2. Стандартные методы для выделения и очистки аллергенов не всегда универсальны. Разные аллергены требуют различных методов извлечения и разделения, что может затруднить процесс стандартизации.

3. Существуют различные способы оценки и сравнения активности аллергенов, что также может затруднить стандартизацию. Некоторые методы могут быть более чувствительными или специфическими, что может привести к различиям в результатах.

4. Необходимость постоянного обновления стандартов. Аллергены могут изменяться со временем, а также могут появляться новые аллергены. Поэтому необходимо постоянно обновлять стандарты, чтобы они оставались актуальными. Стандартизация аллергенов кошки для внедрения в АСИТ является важным шагом в создании эффективной терапии аллергии на кошек [73]. Стандартизация включает в себя создание стандартного изолята аллергена кошки, который содержит определенное количество аллергена и имеет установленную

качественную и количественную характеристику. Важной задачей при стандартизации аллергенов кошки является определение основных компонентов аллергена, которые вызывают реакцию у больных аллергией на кошек. Это позволяет разработать более точные методы определения аллергии и выбора наиболее эффективных аллергенов для лечения. Стандартизация аллергенов кошки также включает в себя разработку конкретных протоколов для их производства, хранения и транспортировки, а также контроля качества. Это обеспечивает стабильность и надежность аллергенов, используемых в АСИТ [79]. В результате стандартизации аллергенов кошки можно достичь более эффективной, точной и безопасной терапии аллергии на кошек, что приводит к улучшению качества жизни пациентов.

Нативные аллергены, которые наиболее широко представлены на коммерческих площадках, уступают рекомбинантным белкам. Преимущество последних состоит в том, что их структура хорошо изучена и содержит все необходимые эпитопы. АСИТ с этими молекулами индуцирует аллерген-специфический блокирующий IgG. Кроме того, еще одно преимущество рекомбинантных молекул перед экстрактами натуральных аллергенов заключается в высоком качестве вакцины, поскольку аллергены можно производить по низкой цене по единому протоколу, что повышает воспроизводимость и эффективность препарата для разных групп пациентов. Недавнее исследование, связанное с использованием очищенных натуральных аллергенов, показало хорошие результаты: обнаружено, что рекомбинантный Alt a 1 эквивалентен природному Alt a 1 [90]. Можно предположить, что этого можно было бы достичь в равной степени с очищенным rAlt a 1.

Таким образом, рекомбинантные аллергены обладают высокой чистотой и стабильностью, что повышает эффективность лечения и уменьшает риск побочных эффектов, и могут быть выбраны из набора наиболее аллергенных компонентов, что позволяет корректировать индивидуальную смесь антигенов в соответствии с клиническими проявлениями у каждого пациента. С экономической точки зрения рекомбинантные аллергены могут быть произведены в больших количествах, что обеспечивает постоянную доступность для лечения.

## 1.6. Перспективы использования рекомбинантных и пептидных аллергенов в аллерген-специфической иммунотерапии

Использование молекулярных подходов в АСИТ со временем эволюционировало [80]. Первоначально исследователи сосредоточились на использовании коротких, нереактивных к IgE пептидов, полученных из аллергенов, содержащих Т-клеточные эпитопы, в качестве способа индуцирования толерантности к аллергенам. За этим последовала разработка рекомбинантных производных гипоаллергенных аллергенов со сниженной реактивностью IgE для повышения безопасности и специфичности. Лишь позднее использование нативных рекомбинантных аллергенов, имитирующих иммунологические свойства молекул природных аллергенов, стало первым подходом к молекулярной АСИТ.

Существуют разные подходы в АСИТ, включают использование пептидов, полученных из аллергенов, гипоаллергенных производных аллергенов, модифицированных аллергенов и рекомбинантных аллергенов. Клинические исследования оценивали безопасность и эффективность этих подходов [35].

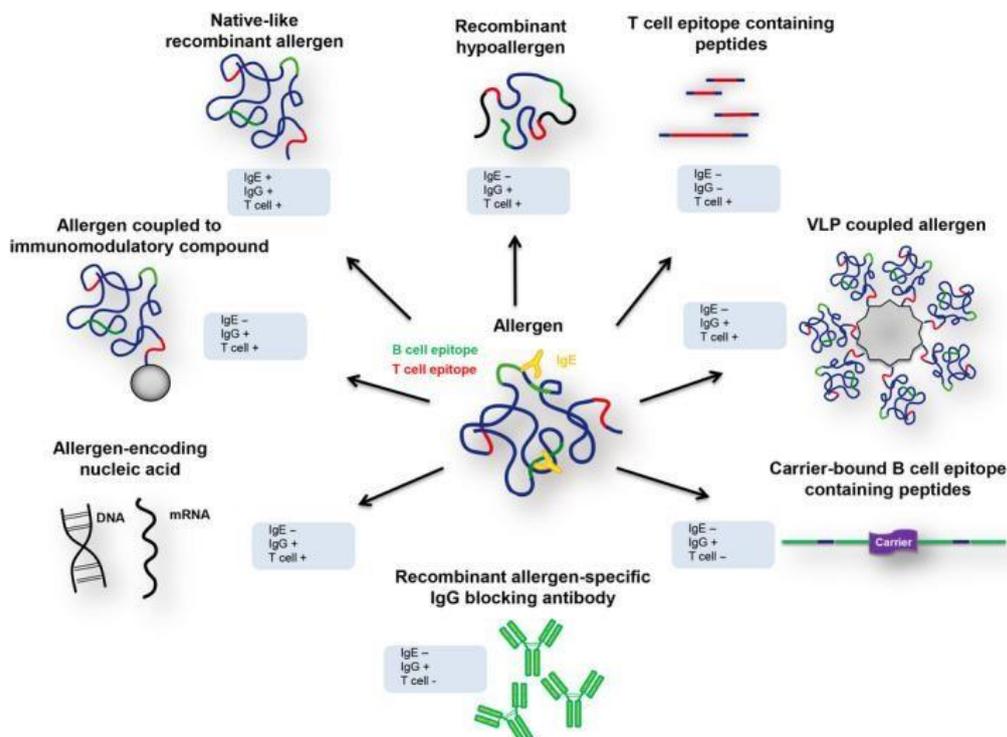


Рисунок 1 – Молекулярные формы АСИТ

Пептиды, содержащие Т-клеточный эпитоп аллергена, представляют собой синтетические пептиды, которые содержат Т-клеточные эпитопы аллергенов, но не обладают реактивностью IgE [60]. Цель введения этих пептидов пациентам – вызвать толерантность Т-клеток и уменьшить выработку аллерген-специфического IgE и воспаление, вызванное аллергеном. Однако первоначальные испытания АСИТ на основе пептидов не увенчались успехом, даже после того, как в последнее время этот подход был усовершенствован [39, 102]. Хотя подход, основанный на Т-клеточном эпитопе, не был эффективен для лечения пациентов с аллергией, вполне возможно, что эта стратегия может быть полезна для индукции толерантности Т-клеток в профилактическом подходе. Однако это еще не изучалось в клинических испытаниях. Необходимы дальнейшие исследования для оптимизации этого подхода и определения его потенциального использования в профилактике аллергии.

Другим подходом, используемым в АСИТ, стали рекомбинантные гипоаллергенные аллергены, которые отличаются по своим механизмам действия способам их получения от пептидов, содержащих Т-клеточный эпитоп [28, 107]. Рекомбинантные гипоаллергенные аллергены получают из рекомбинантных аллергенов, которые становятся гипоаллергенными с помощью генной инженерии или химической модификации: фрагментация, олигомеризация, повторная сборка последовательностей с целью снижения реактивности IgE [61]. Гипоаллергенные молекулы характеризуются пониженной реактивностью IgE и не вызывают немедленных побочных эффектов. При иммунизации они в разной степени индуцируют аллерген-специфические IgG-антитела. Аллерген-специфические Т-клеточные эпитопы остаются в значительной степени сохраненными в этих молекулах и могут вызывать поздние Т-клеточно-опосредованные побочные эффекты.

Таким образом, пептиды, содержащие Т-клеточный эпитоп, направлены на индукцию толерантности Т-клеток, в то время как рекомбинантные гипоаллергенные аллергены направлены на снижение реактивности IgE путем модификации структуры аллергена. Оба подхода продемонстрировали многообещающие результаты в снижении симптомов аллергии в клинических

исследованиях, хотя рекомбинантные гипоаллергенные аллергены оказались более клинически эффективными, чем пептиды, содержащие Т-клеточный эпитоп [80].

Рекомбинантные и пептидные аллергены изучались как потенциальные альтернативы экстрактам натуральных аллергенов при АСИТ аллергии на кошек. Несколько исследований показали, что рекомбинантные молекулы Fel d 1 и Fel d 4 хорошо переносятся и могут вызывать иммунный ответ у пациентов с аллергией [8, 75]. АСИТ на основе пептидов – еще один многообещающий подход к лечению аллергии на кошек. Пептиды представляют собой короткие последовательности аминокислот, полученные из аллергенных белков, которые могут имитировать эпитопы Т-клеток, ответственные за иммунные реакции.

В целом использование рекомбинантных и пептидных аллергенов при АСИТ аллергии на кошек имеет большие перспективы для повышения безопасности, эффективности и специфичности аллерген-специфической терапии. Однако необходимы дополнительные исследования для оценки клинической значимости и характеристики известных на данный момент алергокомпонентов.

Один из способов оптимизации стандартизации экстрактов аллергенов при АСИТ аллергии на кошек – использование рекомбинантных аллергенов. Рекомбинантные аллергены можно производить контролируемым образом благодаря стандартизированным протоколам, обеспечивая одинаковую чистоту, качество и активность, что необходимо для стандартизации [71, 89].

Рекомбинантные аллергены можно использовать отдельно или в сочетании с другими аллергенами для создания смесей, адаптированных к индивидуальной чувствительности пациента. Такой подход позволяет проводить более целенаправленное и персонализированное лечение, что может повысить эффективность и снизить риск побочных эффектов.

Еще один способ оптимизировать стандартизацию экстрактов аллергенов при АСИТ аллергии на кошек – использовать передовые аналитические методы для характеристики компонентов аллергенов [98]. Масс-спектрометрия, секвенирование белков и другие методы могут использоваться для идентификации и количественного определения отдельных аллергенных компонентов в экстрактах аллергенов [1, 52, 81,]. Эти методы могут быть использованы для разработки

стандартизированных воспроизводимых экстрактов и смесей аллергенов при АСИТ [2].

В целом использование рекомбинантных аллергенов и передовых аналитических методов может помочь оптимизировать стандартизацию экстрактов аллергенов при АСИТ при аллергии на кошек, повышая безопасность и эффективность лечения.

### **1.6.1. Попытки создания пептидного аллерген-специфической иммунотерапии против аллергии на кошку**

Разработка и совершенствование АСИТ аллергии на кошку – одно из наиболее перспективных направлений. Исследования в этой области ведутся достаточно давно, еще в 1998 году Rene J et al. изучили влияние иммунотерапии пептидами Fel d 1 на показатели бронхиальных провокационных тестов с использованием стандартизированного кошачьего экстракта Fel d 1 на Fel d 1-специфические сывороточные уровни IgE и IgG [53].

По результатам этого исследования однократная доза нейтрализующих Fel d 1 антител IgG улучшала назальные симптомы у пациентов с аллергией на кошек. Наблюдалось, что пиковые концентрации лекарственного средства в сыворотке соответствовали максимальному клиническому ответу, что свидетельствует об эффективности лечения. Однако не было корреляции между улучшением показателя гиперреактивности дыхательных путей и снижением продукции IL-4, что свидетельствует о том, что клинический эффект пептидной иммунотерапии может зависеть не только от снижения продукции IL-4. Исследование также показало, что соотношение анти-Fel d 1 IgE/кошачьей перхоти IgE в сыворотке до лечения коррелирует с улучшением общей оценки назальных симптомов, что указывает на то, что лечение может быть более эффективным у пациентов с более высоким уровнем анти-Fel d 1 IgE антител.

Несмотря на успехи вначале, создание АСИТ для лечения аллергии на кошек остается достаточно сложной задачей. Одна из основных проблем заключается в том, что первичный кошачий аллерген, Fel d 1, представляет собой сложный белок,

который трудно производить и очищать в больших количествах. Это затрудняет разработку стандартизированных и последовательных экстрактов Fel d 1 для АСИТ [97]. Кроме того, современные препараты, которые применяются в АСИТ при аллергии на кошек, обладают выраженными нежелательными явлениями, что ухудшает качество жизни пациента и его приверженность к терапии и снижает эффективность проводимого лечения [18]. Особенно высок риск побочных эффектов в начальном периоде, когда идет постепенное увеличение дозы аллергена в течение нескольких недель или месяцев до достижения целевой поддерживающей дозы. На этом этапе существует риск анафилактических реакций, которые могут быть опасными для жизни.

Кроме того, в некоторых исследованиях было обнаружено, что АСИТ при аллергии на кошек имеет ограниченную клиническую эффективность, при этом наблюдается лишь незначительное уменьшение симптомов и использование лекарств. Это может быть связано с тем, что аллергия на кошек является сложным и многофакторным состоянием, включающим несколько аллергенов, а также неаллергенные триггеры, такие как раздражители и загрязняющие вещества. Хотя Fel d 1 является основным аллергеном, ответственным за аллергию на кошек, исследования показывают, что его может быть недостаточно для достижения полного клинического ответа при АСИТ.

Отсутствуют стандартизированные протоколы АСИТ при аллергии на кошек, что приводит к различиям в дозировке, продолжительности лечения и критериях отбора пациентов. Это затрудняет сравнение результатов различных исследований и определение оптимального подхода к АСИТ при аллергии на кошек.

Для создания более эффективной АСИТ аллергии на кошек, необходимо исследовать все кошачьи аллергены, а не только Fel d 1, поскольку аллергия на кошек может быть вызвана комплексом белковых молекул, содержащихся в кошачьей перхоти, слюне и моче. Хотя Fel d 1 является наиболее известным и распространенным аллергеном у кошек, существует множество других белков, которые также могут вызывать аллергическую реакцию. Для создания эффективной АСИТ при аллергии на кошек необходимо выявить и включить в лечение как можно больше релевантных аллергенов.

Исследования показали, что АСИТ с использованием комбинации нескольких кошачьих аллергенов может привести к улучшению клинических результатов по сравнению с АСИТ с использованием только Fel d 1 [86]. Исследование всех кошачьих аллергенов важно для создания более комплексной и эффективной АСИТ при аллергии на кошек, поскольку это позволяет нацеливаться на несколько аллергенов, которые могут способствовать возникновению симптомов у пациента.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Характеристика пациентов

В исследовании приняли участие 84 пациента в возрасте от 18 до 52 лет с подтвержденными симптомами аллергии на кошку. Для оценки профиля сенсибилизации была выбрана когорта пациентов, проживающих на территории Москвы, Московской области и Екатеринбурга, сыворотки которых находились в банке сывороток лаборатории иммунопатологии Института молекулярной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Каждый пациент, который был включен в исследование, подробно ознакомлен с информацией о методе и дизайне работы, после чего от всех участников было получено добровольное письменное согласие на участие в исследовании согласно форме, одобренной Межвузовским комитетом по этике при Ассоциации медицинских и фармацевтических работников.

Критериями включения в группу были: 1) совершеннолетние пациенты; 2) клинические проявления аллергии при контакте с кошками.

На первом этапе отбора пациентов каждый из участников заполнил стандартизированный адаптированный опросник ISAAC для верификации симптомов аллергии, представленный в Приложении А [57]. Для всех пациентов была также собрана информация по проведенным стандартным методам лабораторной диагностики, включая сбор анамнеза, кожный прик-тест и/или специфического IgE [10, 32]. На момент тестирования пациенты не получали никакой терапии. Кожные прик-тесты для подтверждения сенсибилизации к кошкам были проведены у 66 пациентов с аллергическими симптомами при воздействии на кошку с использованием экстрактов кошачьих аллергенов от Microgen (Москва, Россия) или Stallergenes (Antony, Франция). Из 85 пациентов с клиническими симптомами воздействия кошек, которые изначально входили в исследование, один пациент с отрицательным результатом кожного теста на экстракт кошачьей перхоти был исключен из исследуемой популяции.

Сенсибилизация к экстракту кошачьей перхоти была подтверждена кожными пробами у 70 из 84 пациентов; для 14 пациентов результаты кожных проб не были доступны, но эти пациенты были оставлены в исследовании, потому что у них проявлялись задокументированные аллергические симптомы при контакте с кошкой. После оценки сенсибилизации к экстракту шерсти кошки и сумме аллергокомпонентов сенсибилизация подтверждена у 73 пациентов. Аллергические симптомы при контакте с кошкой были классифицированы как астма в соответствии с критериями ATS/ERS от 2014 года, и они были классифицированы как ринит в соответствии с рекомендациями GINA и Европейскими рекомендациями по классификации ринита [63, 70, 72]. Кроме того, в соответствии с рекомендациями были записаны рекомендации по оценке конъюнктивита и кожных проявлений [6, 108]. Также была проведена верификация проявлений кожных симптомов: атопического дерматита и крапивницы. Только пациенты с атопическим дерматитом были включены в группу «дерматит». Исследование, на базе которого был сформирован биобанк сывороток и частью которого является исследование, которому посвящена данная диссертационная работа на соискание степени кандидата медицинских наук, было одобрено комитетами по этике институциональных наблюдательных советов ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и московских вузов, а также Уральского государственного медицинского университета; исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией. Каждый пациент подписал форму информированного согласия.

У каждого пациента было достаточно времени, чтобы подробно ознакомиться с предложенной информацией, задать интересующие вопросы обученному медицинскому персоналу.

От всех исследуемых пациентов, прошедших анкетирование, получали 9 мл венозной крови, центрифугировали, сыворотку аликвотировали в малых объемах, для дальнейшего анализа. Кровь собирали в пробирки с активатором свертывания и гранулами (инертными полистироловыми гранулами с удельным весом меньше удельного веса сгустка крови, но больше удельного веса сыворотки крови; в

процессе центрифугирования гранулы поднимаются со дна пробирки и образуют разделительный барьер между сгустком и сывороткой крови, что облегчает получение сыворотки для исследования), цвет крышки пробирки – красный, желтый. Медицинскому персоналу, обеспечивающему забор биоматериала, был предоставлен протокол взятия биоматериала во избежание технических ошибок:

Протокол взятия биоматериала для исследования «Особенности профиля IgE-сенсibilизации к панели молекулярных аллергенов Fel d 1-8 у пациентов с клиническими симптомами аллергии на кошку» «Cat Project».

Материал для исследования: сыворотка. Биоматериал: венозная кровь.

Объем: 9 мл.

Протокол взятия венозной крови: стандартный протокол.

Тара: пробирки с активатором свертывания и гранулами (инертными полистироловыми гранулами с удельным весом меньше удельного веса сгустка крови, но больше удельного веса сыворотки крови; в процессе центрифугирования гранулы поднимаются со дна пробирки и образуют разделительный барьер между сгустком и сывороткой крови, что облегчает получение сыворотки для исследования), цвет крышки пробирки – красный.

Получение сыворотки: протокол центрифугирования – 10 минут, 1300 g (при отсутствии таблицы перевода в об/мин на центрифуге ниже приведена шкала расчета, где радиус ротора – расстояние от центра ротора до дна пробирки (для угловых центрифуг в положении максимального отклонения), для стандартных центрифуг среднего размера 400–4500 об/мин) (рисунки 1 и 2).

После получения сыворотки необходимо перенести ее в пластиковую тару (стандартные пластиковые пробирки, стерильные, без наполнителя), маркировать ФИО пациента и дату, заморозить при температуре – 20 С в течение 60 минут после центрифугирования.

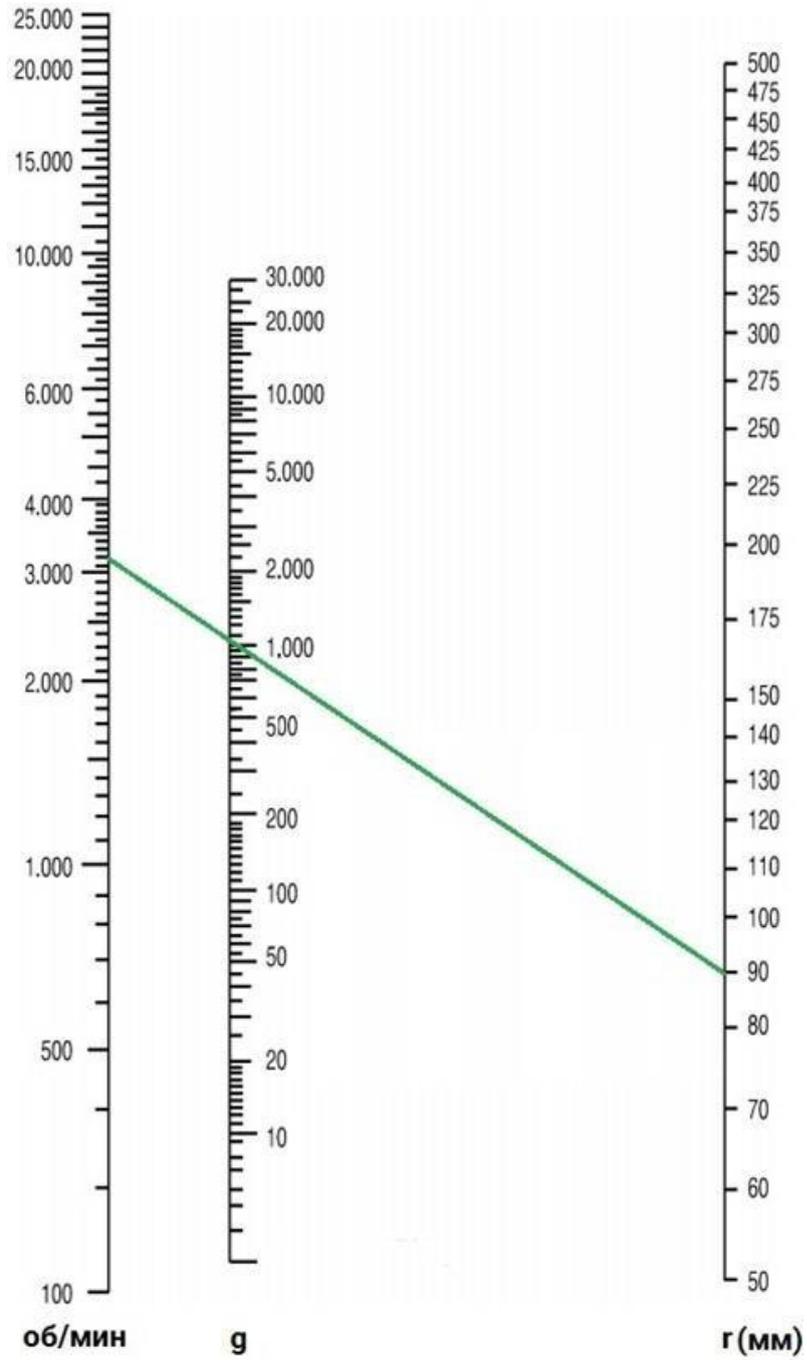
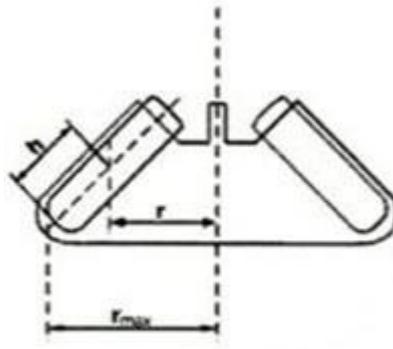


Рисунок 2 – Рекомендуемое расстояние от центра ротора до дна пробирки

## 2.2. Реактивы, расходные материалы и оборудование

### 2.2.1. Реактивы

- раствор трипанового синего, 0.4%, Invitrogen, 100 мл;
- среда MEM alpha, GlutaMAX™ Supplement, 500 мл, Invitrogen;
- сыворотка инактивированная, сертифицированная Fetal Bovine Serum, 0,5 л, Gibco;
- глютамин-L 100-кратный, 200 мМ, Invitrogen, 100 мл;
- антибиотик селективный Geneticin, Life technologies, 50 мг/мл, 20 мл;
- меркаптоэтанол-b/b-Mercaptoethanol, Molecular biology grade, AppliChem, 100 мл;
- гигромицин (hygromycin B), 20 мл, Invitrogen;
- пенициллин-стрептомицин (10,000 U/mL), Gibco, 100 мл;
- натрий хлористый, for analysis EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck, 1 кг;
- лимонная кислота моногидрат EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, 1 кг, Merck;
- перекись водорода, 30 %, stabilized pure, Panreac, 1 л;
- натрий фосфат, 2-замещ., 2-водный, для анализа, Emsure, >99,5%, 1 кг, Merck;
- альбумин бычий сывороточный (БСА), >99%, Диаэм, 1 кг;
- акриламид/бис-акриламид, 30% раствор, BioReagent, Sigma, 5x100 мл;
- акриламид/бис-акриламид, 40% solution, for electrophoresis, 19:1, 5x100 мл, Sigma;
- ИПТГ (изопропил-бета-D-тиогактопира нозид), BioChemica, AppliChem;
- мочеви́на, не менее 99,5%, Molecular biology grade, AppliChem, 1 кг;
- натрий дигидрофосфат дигидрат чда фарм. E339, Merck, 1 кг;
- соли тиро́да без бикарбоната натрия порошок, подходящий для клеточной культуры, 10x1л, Sigma;

- тритон X-100, Molecular Biology grade, AppliChem, 1 л;
- азино-2,2-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоной кислоты) двуаммониевая соль, >98%, TLC, Sigma, 5 г;
- реактив 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat, 25 мг, Sigma;
- калий хлорид, для анализа, Merck, 1000 г;
- уксусная кислота (ледяная), (USP, BP, Ph. Eur.) pure, pharma grade, >99,5-100,5 %, Panreac, 1 л;
- пропанол-2/2-Propanol Molecular biology grade, AppliChem, 2,5 л;
- глицин, pure EP, USP >=98,5%, имп, 1 кг;
- трис (гидроксиметил)аминометан, для аналитики (ACS), Panreac, 1 кг;
- аммоний персульфат (надсерноокислый) для электрофореза, 98%, BioChemica, AppliChem, 250 г;
- ТЕМЕД (Тетраметилэтилендиамин-N,N,N,N), 99%, Sigma-Aldrich, 100 мл;
- метилумбелиферил-4-b-D-глюкоринд гидрат, 98% (TLC), Sigma, 25 мг;
- натрий гидроксид/Sodium Hydroxide pellets (RFE, USP-NF, BP, Ph. Eur.) PRS-CODEX, Panreac, 1 кг;
- натрия гидрокарбонат, фарм (RFE, USP, BP, Ph. Eur.), Panreac, 1 кг;
- диметилсульфоксид (ДМСО), 99,9 %, для анализа, ACS, Panreac, 1 л;
- антитела Anti-IgE antibody [RM122], кроличьи, моноклональные, 100 мкл, Abscam;
- парафилм М, ширина 10 см, длина 38 м, Pechiney Plastic Packaging;
- дюльбекко фосфатно-солевой раствор, стерильный, 500 мл, НПП «ПАНЭКО»;
- набор для аффинной хроматографии с никелем (Qiagen);
- антитела ImmunoCAP Specific IgE Anti-IgE, Thermo;
- реагент Stop Solution, Thermo;
- реагент Washing Solution, Thermo;
- конъюгат Specific IgE (Conjugate, Curve Controls), Thermo;
- стрептавидин o212, Thermo;
- индикатор для электрофореза Rage Ruler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, 2x250 мкл в упаковке;

- раствор трипанового синего, 0.4%, Invitrogen;
- ImmunoCap Specific IgE Calibrators;
- ImmunoCAP Specific IgE 0-100;
- ImmunoCAP e1;
- ImmunoCAP fx5;
- ImmunoCAP f2.

### 2.2.2. Расходные материалы

- пробирки 15 мл, центрифужные, конические, CentriStar, PP, с завинч. крышкой, стерильные, 12000g;
- пробирки 50 мл, центрифужные, конические, PP, с завинч. крышкой Plug Seal, стерил., без юбки, g;
- наконечники до 200 мкл (от 1 мкл), желт, с фаской;
- наконечники до 1000 мкл, универсальные, голубые;
- наконечники до 100 мкл, с фильтром, универс, Maximum Recovery;
- наконечники до 200 мкл (от 1 мкл), с фильтром, бесцвет., стерильн.
- пробирки 2 мл с замком Safe-Lock, для ПЦР;
- пробирки 1,5 мл, типа эппендорф, градуированные, бесцветн., с безопасн. замком, PCR clean;
- авт. пипетка 20–200 мкл, Pipetman Neo, 8x200 мкл, 8-кан., Gilson;
- авт. пипетка 2–20 мкл Pipetman Neo P20N, Gilson;
- авт. пипетка 20–200 мкл Pipetman Neo P200N, Gilson;
- авт. пипетка 100–1000 мкл Pipetman Neo P1000N, Gilson;
- штатив-карусель для авт. пипеток, 7 мест, Gilson;
- держатель для дозаторов любой модели, одиночный, Gilson;
- планшеты 96-лун., культуральные. низкое испарение, с крыш., стер., в инд. уп.;
- планшеты 96-лун, для ИФА, плоскодонные, без крышки, полистироловые, Greiner;
- планшеты для ИФА 96-луночные без крышки, MaxiSorp, нестерильные,

Nunc;

- пробирки 5 мл, 12x75 мм, стекло Pyrex, Corning;
- пипетки стеклянные, 25 мл, ц.д. 0,03 мл, Corning;
- пипетки стеклянные, серологические 10 мл, 0,1 мл, Corning;
- пенал для стерилизации пипеток цилиндр, н/сталь, дно и кр. с сил. покр.,

450–442 мм, d 65 мм, Vochem;

- скребок клеточный мал., шир. 1,8 см, дл. 25 см, 1 шт. в индивид. уп.,

Corning;

- стакан 250 мл BEAKER, Corning;
- стакан 600 мл BEAKER, Corning;
- стакан 100 мл PYREX, Beacker, низкий, двойная шкала, интервал 10 мл,

Corning;

- стакан 1 л, PYREX, градуированный, 6 шт/уп, 24 шт/кор, Corning;
- стакан 50 мл PYREX, Beacker, низкий, двойная шкала, интервал 10 мл, 12

шт/уп, 48 шт/кор, Corning;

- колба конич. Эрленмейера 250 мл, узкогорлая, Heavy Duty Rim, с градуир.,

Corning;

- колба конич. Эрленмейера 500 мл, узкогорлая, Heavy Duty Rim, с градуир.,

6 шт/уп, 36 шт/кор, Corning;

- колба конич. Эрленмейера 1 л, узкогорлая, Heavy Duty Rim, с градуир., 24

шт/кор, Corning;

- бутыль для хранения реактивов стеклянная, с синей завинч. крышкой,

500 мл, Simax;

- бутыль для хранения реактивов стеклянная, с синей завинч. крышкой,

250 мл, Simax;

- бутыль для хранения реактивов стеклянная, с синей завинч. крышкой, 2000

мл, Simax;

- бутыль для хранения реактивов стеклянная, с синей завинч. крышкой, 1000мл,

Simax;

- чашки Петри, d 100 мм, выс. 15 мм, ПС, Thermo.

### 2.2.3. Оборудование

- весы 1210г/ 0,01 г, платформа 165 x 165 мм, внешняя калибровка, GF-1200, AND;
- весы GX-1000, 1100г x 0,001 г лабораторные, электронные, с поверкой, A&D;
- мешалка магнитная RH basic, нагрев до 320°C, 2000 об/мин, ИКА;
- магнитный перемешивающий элемент, цилиндр форма, тефлон. покрытие, 25, 40 и 50 мм, 3 шт., Heidolph;
- магнитный перемешивающий элемент, Ikaflon 15, овал., тефлон, 6x15 мм, ИКА;
- Ultra-Turrax (Ика, Stauffen, Germany);
- магнитный перемешивающий элемент Ikaflon 30, овал., тефлон, 8x30 мм, 1 шт., ИКА;
- термошейкер ThermoMixer F1.5 для пробирок 1,5 мл, 1500 об/мин, Eppendorf;
- адаптер для планшета SBS формата для роторов А-2-МТР и А-2-DWP, набор из 2, Eppendorf; Адаптер для всех подвесок для 96-лун. ПЦР планшет, 2 шт/уп., Eppendorf;
- рН-метр/иономер ИТАН, электрод ЭСК-10603 в комплекте, Томьаналит; Стандарт-титр рН 9,21, 7,00, 4,01, 10,01, 20 мл, 1 пакетик, Mettler Toledo;
- спектрофотометр ПЭ-5400УФ, однолуч., 190–1000 нм, Экохим;
- вортекс Vortex 2, до 2500 об/мин, амплитуда 4 мм, ИКА;
- вставка VG 3.1 стандартная, для вортекса Vortex 2, ИКА;
- морозильник, 513 л, -14...-28 °С, н/ж сталь, Liebherr; камера для электрофореза Criterion Cell с источником питания 100–120/220–240 V, Bio-Rad;
- система для блота Criterion Blotter With Plate Electrodes, площадь 150\*94 мм, BioRad;
- кассеты Ready Criterion Cassetts, пустые, 1.0 thick, 12 + 2comb, 10 шт, Bio-Rad;

- дозатор пипеточный электрический Easypet 3 0,1–100 мл, Eppendorf;
- холодильный шкаф 5410, со глухой дверью, 554 л, от +1°C до +15°C, ручная регулировка темпер. Цвет серебристый, Liebherr;
- анализатор Phadia100 серийный номер 61010-2-101-4 для проведения анализа;
- ImmunoCAP по оценке IgE-реактивности сывороток;
- мультимодальный ридер для детекции результатов при постановке ELISA и RBL;
- бокс биологической безопасности 2-го класса тип А2 (ламинар) LABCONCO;
- инкубатор Jouan SA, New Brunswick Galaxy 170;
- баня водяная Precision PGP 05, 5 л;
- ультранизкотемпературный морозильный шкаф Eppendorf (до -60°C);
- система для блота Criterion Blotter, BioRad;
- микроскоп Микмед 6 74СТ, ЛОМО;
- микроскоп МСП-1 22, ЛОМО.

### 2.3. Экспрессия и очистка аллергенов

rFel d 1 (рекомбинантный Fel d 1) экспрессирован в культуре *Escherichia coli* и далее подвержен очистке согласно ранее описанным протоколам [94]. Очищенные натуральные Fel d 2 и Fel d 6 были приобретены у Sigma (Вена, Австрия), а антитела и анализы были приобретены у Rockland (Пайквилл, Мэриленд, США). Гены, которые отвечали за синтез Fel d 3, Fel d 4, Fel d 7 и Fel d 8 с 3'-ДНК, кодирующей С-концевой гексагистидиновый хвост, были синтезированы и кодон-оптимизированы для экспрессии *E. coli*.

После синтеза полученные генетические последовательности были инкорпорированы в сайты *NdeI/EcoRI* плазмиды pET27b (ATG, мерцхаузен, Германия). Корректное встраивание синтезируемой последовательности ДНК в плазмиду подтвердило секвенирование обеих цепей ДНК. После трансформации *E. coli* BL21 DE3 плазмидами, которые экспрессируют Fel d 3, Fel d 4, Fel d 7 и Fel d

8, поместили в среду LD и выращивали при 37°C в инкубаторе. Среда LD содержала канамицин (34 мкг/мл). Культура клеток была помещена в среду LD до достижения плотности клеток (OD<sub>600</sub> нм) 0,3–0,6. Экспрессия белков rFel d 3 или rFel d 7 проводилась после добавления 1 мМ изопропил-β-тиогалактопиранозиды в течение 3 ч при 37°C. Центрифугирование клеток проводили при 10 000 оборотах в течение 10 минут при температуре 37°C.

Далее после центрифугирования клетки подвергались заморозке. Осадок из 400 мл культуры обрабатывали тремя циклами замораживания и оттаивания, переливали в 40 мл 20 мМ Трис-НСl (рН 7) и 10 мМ имидазола, а затем инкубировали в течение ночи при 4°C, постоянно перемешивая. После центрифугирования осадок удаляли, а супернатанты подвергали аффинной хроматографии в нативных условиях, как описано в протоколе очистки Qiagen (Qiagen, Хильден, Германия).

Экспрессия аллергенов rFel d 4 или rFel d 8 проводилась после добавления 1 мМ изопропил-β-тиогалактопиранозиды в течение 3 ч при 37°C. Клетки отделяли с помощью центрифугирования при 10 000 оборотах в течение 10 минут, после чего замораживали. Осадок из 400 мл культуры повторно суспендировали в 40 мл 8 М мочевины, 10 мМ трис-НСl (рН 8) и 100 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Далее полученные растворы гомогенизировали с помощью Ultra-Turrax (Ika, Stauffen, Germany) на льду; и затем инкубировали в течение ночи при 4°C при постоянном перемешивании. Супернатант подвергали аффинной хроматографии с никелем в денатурирующих условиях (Qiagen). Фракции Fel d 4 и Fel d 8, содержащие чистый белок, объединяли и рефолдировали путем экстенсивного ступенчатого диализа 2 мМ HEPES (рН 8) в случае и 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 20 мМ Трис-НСl (рН 8,5) соответственно; их хранили в PBS в виде растворимых белков при -20°C до использования. Чистоту рекомбинантных белков и природных аллергенов анализировали с помощью SDS-PAGE (Таблица 4). Молекулярную массу аллергенов определяли методом времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией на матрице согласно ранее опубликованным материалам [48].

## 2.4. Оценка функциональной активности полученных аллергенов

Для оценки функциональной активности полученных аллергенов был использован протокол ELISE с применением сыворотки пациентов и аллергенов для обнаружения антител IgE. Протокол ELISA включал покрытие аллергенов, блокирование, инкубацию первичных и вторичных антител и обнаружение IgE с помощью раствора ABTS. Тест ELISA выполняется в двух экземплярах для обеспечения точности.

Реагенты, необходимые для теста ELISA, включают PBS-Tween, 100 мМ бикарбонатный буфер и раствор ABTS. PBS-Tween готовили с использованием фосфатно-солевого буфера (PBS) и Tween-20, тогда как бикарбонатный буфер был изготовлен с помощью  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и  $\text{NaHCO}_3$  для достижения pH 9,6. Раствор ABTS изготовили с использованием лимонной кислоты и  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  для достижения pH 4. Перед проявлением к 10 мл раствора ABTS добавляли 10 мг порошка ABTS и 1 мкл 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Результаты оценки функциональной активности аллергенов показали, что полученные молекулы были способны вызывать ответ у пациентов с подтвержденной сенсibilизацией. Это указывает на то, что аллергены были функционально активны, способны индуцировать иммунный ответ.

Кроме того, тест ELISA, выполненный с двойным измерением в равных условиях, обеспечил точность полученных результатов. Использование 100 мМ бикарбонатного буфера и раствора ABTS дополнительно обеспечивало специфичность и чувствительность теста.

## 2.5. Биотинилизация аллергенов

Для количественной детекции специфических антител IgE была выбрана система ImmunoCAP™ (Thermo Fisher Scientific/Phadia, Uppsala, Sweden). Для того чтобы определить, есть ли сенсibilизация на аллергены кошек у группы испытуемых пациентов, было решено биотинилировать экспрессированные аллергены для дальнейшей оценки IgE-реактивности на приборе ImmunoCAP.

На первом этапе биотинилирования рекомбинантных белков для удаления побочных продуктов концентрированные растворы Fel d 1 – Fel d 8 были подвергнуты диализу. Благодаря этому были удалены различные буферные соли, загрязняющие примеси, восстанавливающие агенты, консерванты, реагенты детекции. Диализ был осуществлен с использованием кассет для диализа 0.5 мл (Slide-A-Lyzer™ Thermo scientific), которые представляют собой полупроницаемую мембрану с размером пор 3,5 кДа (3.5K MWCO), обеспечивающих процесс диализа посредством механизмов селективной и пассивной диффузии. В буферный раствор объемом 1 литр, заранее приготовленный и содержащий 0.1 М NaHCO<sub>3</sub>, NaCl, была помещена кассета для диализа на 1–2 минуты с целью гидратации полупроницаемой мембраны. После завершения процесса гидратации мембрана извлекалась из буферного раствора для диализа с последующим удалением избытка жидкости. Далее в полупроницаемую мембрану кассеты для диализа были добавлены концентраты образцов аллергенов при помощи шприца, после чего кассета снова помещалась в раствор для диализа. При проведении диализа замена буфера проводилась 2 раза. Диализ аллергенов происходил в течение 8 часов. На следующий день полученные концентраты аллергенов после диализа были удалены из кассет.

В конце первого этапа биотинилирования аллергенов проводился расчет их концентрации, чтобы подобрать необходимое количество биотина для последующего этапа биотинилирования. До проведения биотинилирования был подготовлен свежий раствор биотина (Biotin-X-X-NHS, биотинамидогексаноил-6-аминогексановая кислота N-гидроксисукцинимидный эфир, Sigma,) с содержанием биотина 10 мг/мл в растворе DMF (диметилформамид, Roth, A529.1). После

подготовки концентрированного раствора биотина к каждому образцу рекомбинантных белков был добавлен требуемый объем ( $\mu\text{L}$ ) биотина с 5-кратным избытком. Расчет количества требуемого биотина для каждой реакции биотинилирования зависел от концентрации белка. Известно, что при использовании оптимального молярного соотношения биотина к белку регулируется степень мечения белка. При мечении разбавленных белковых растворов мы использовали большой молярный избыток биотина [34].

Для биотинилирования аллергенов было подсчитано оптимальное использование 5-кратного молярного избытка биотина. Для расчета необходимого объема биотина для биотинилирования аллергенов была использована формула 1.

Формула 1:

$$V(\text{биотина}) = (C(\text{аллергена})) / (M_w(\text{аллергена}) \times 5 \times V(\text{аллергена})) \div (M_w(\text{биотина}) / C(\text{биотина})).$$

–  $V$  (биотина) – объем биотина в  $\mu\text{L}$ , который необходимо взять для биотинилирования аллергенов;

–  $M_w$ -молекулярная масса;

– 5-кратный молярный избыток биотина.

Рассчитав необходимый объем биотина, в смесь добавляли биотинилируемый аллерген, тщательно перемешивали и в дальнейшем инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Эта процедура диализа аллергенов повторялась 2 раза в буфере PBS. Описанная процедура биотинилирования и диализа аллергенов привела к удалению избытка биотина и других побочных продуктов реакции, что подтвердило качество полученных образцов аллергенов. В экспериментах по тестированию на аллергию измеряли уровень специфических антител IgE в крови для оценки степени сенсибилизации к конкретному аллергену. Референтное значение 0,1 кЕд/л широко используется в клинических исследованиях и практике в качестве порога для положительного sIgE и указывает на возможность аллергической сенсибилизации. Тот факт, что в исследовании использовалось это референтное значение, позволяет предположить, что полученные результаты согласуются с установленным стандартом оценки аллергической сенсибилизации.

## 2.6. Количественное определение уровней аллерген-специфического IgE

Для количественного определения уровней аллерген-специфического IgE использовали прибор ImmunoCAP Phadia 100 (Thermo Fisher Scientific/Phadia, Уппсала, Швеция) в соответствии с инструкциями производителя. Стрептавидиновые ImmunoCAP (o212 ImmunoCAP, Thermo Fisher Scientific/Phadia) использовали для получения rFel d 1, nFel d 2, rFel d 3, rFel d 4, nFel d 6, rFel d 7 и rFel d 8. Уровни специфического IgE определяли с использованием коммерческого ImmunoCAP e1 (Thermo Fisher Scientific/Phadia). Для приготовления молекулярных аллергенов ImmunoCAPs со стрептавидином o212 ImmunoCAPs каждый аллерген подвергали экстенсивному диализу против 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> и 1 М NaCl при 4<sup>0</sup>С в течение не менее 8 часов. Затем определяли концентрацию аллергена и метили биотином. Уровни аллерген-специфического IgE, превышающие или равные 0,1 кЕА/л, считались положительными.

На первом этапе иммуноферментного анализа осуществлялось покрытие биотинилированных аллергенов по 100  $\mu$ L (5 $\mu$ g/ml) на 96-луночные планшеты (Nunc®, 442404) и инкубация их при 4<sup>0</sup>С в течение ночи. На следующее утро планшеты отмывались 3 раза от несвязавшихся молекул аллергена с помощью раствора PBS-Tween. По завершении отмывки в планшеты был добавлен блокирующий буфер по 200  $\mu$ L (3% BSA [Sigma-Aldrich] в PBS-Tween) для предотвращения неспецифического связывания. Инкубация с блокирующим буфером была осуществлена в течение 2,5 часов при температуре 37<sup>0</sup>С. Затем осуществлялась инкубация пероксидазы хрена, конъюгированной с авидином (авидин-HRP, BD Pharmingen™, 554058). Авидин-HRP добавлялся по 100  $\mu$ L в разведении 1:1000. После этого планшета была инкубирована на 30 минут при температуре 37<sup>0</sup>С. После инкубации планшета была промыта 3 раза раствором PBS-Tween. Далее осуществлялась детекция исследуемых образцов. Для этого добавлялся раствор ABTS, состоящий из субстрата пероксидазы (2,2'-Азинобис [3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота] диаммониевой соли, Sigma-Aldrich, A1888), пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и буферного раствора (лимонная кислота,

дигидрат двухосновного фосфата натрия в деионизированной воде, pH 4). Далее осуществлялась детекция оптической плотности (OD 405 нм) биотинилированных аллергенов на мультимодальном ридере (CLARIOstar®, BMG Labtech) каждые 5 минут в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте.

## **2.7. Статистическая обработка результатов**

Для статистических расчетов использовались SPSS Statistics версии 15.0 и Graphpad Prism версии 6.0. Значимые различия были рассчитаны с использованием U-критерия Манна–Уитни.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Клиническая характеристика пациентов

В исследование было включено 84 пациента с клиническими проявлениями аллергии на кошку (рисунок 3). В группу вошли 57 (68 %) мужчин и 27 (32 %) женщин в возрасте. Средний возраст пациентов составлял 27,19 лет. Сенсibilизация к экстракту кошачьей перхоти была подтверждена кожными пробами у 70 из 84 пациентов; для 14 пациентов результаты кожных проб не были доступны, но эти пациенты были оставлены в исследовании, потому что у них проявлялись задокументированные аллергические симптомы при контакте с кошкой. Спектр аллергических проявлений включал астму, ринит, конъюнктивит и дерматит с подтвержденной сенсibilизацией к кошкам в анамнезе. Среди них 67 пациентов страдали астмой, 81 пациент страдал ринитом, 70 пациентов – конъюнктивитом и 20 пациентов имели симптомы дерматита. Характеристика пациентов представлена в таблице 2.

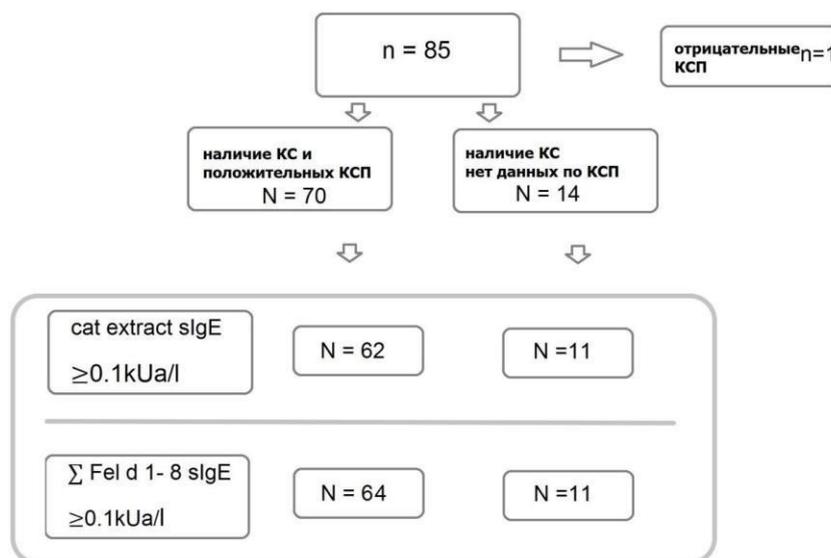


Рисунок 3 – Схема тестирования пациентов

Таблица 2 – Характеристика пациентов

Пол		Средний возраст (min-max)	Симптомы сенсibilизации			
м	ж		астма	ринит	конъюнктивит	дерматит
57	27	27,19 (18–53)	67	81	70	20
<b>Пациенты с уровнем специфических IgE антител &gt; 0,1 кЕд А /л ( N = 73)</b>						
50	23	26,71 (18–52)	59	70	61	19

### 3.2. Результаты оценки профиля сенсibilизации к алергокомпонентам кошки

Среди данной когорты пациентов был проведен анализ на Fel d 1, Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 6, Fel d 7, Fel d 8, а также анализировался экстракт алергена кошки. В качестве положительного уровня было принято принимать 0.1 кUa/l. Контрольная точка 0,1 кЕА/л в испытаниях на алергию основана на измерении специфических антител IgE (sIgE) в крови. Уровень sIgE в крови является мерой степени сенсibilизации к конкретному алергену: более высокий уровень sIgE указывает на большую вероятность алергической реакции на этот алерген. Референсное значение 0,1 кЕА/л используется потому, что оно представляет собой уровень sIgE, при котором существует 95 % вероятность положительного кожного теста на исследуемый алерген. Уровень sIgE ниже 0,1 кЕА/л считается отрицательным или клинически незначимым, а уровень выше 0,1 кЕА/л считается положительным и свидетельствует о возможной алергической сенсibilизации. Эта точка отсчета широко используется в клинических исследованиях и практике для оценки алергической сенсibilизации и контроля эффективности лечения алергии [21, 57]. На рисунке 4 можно отметить более высокую чувствительность второго подхода.

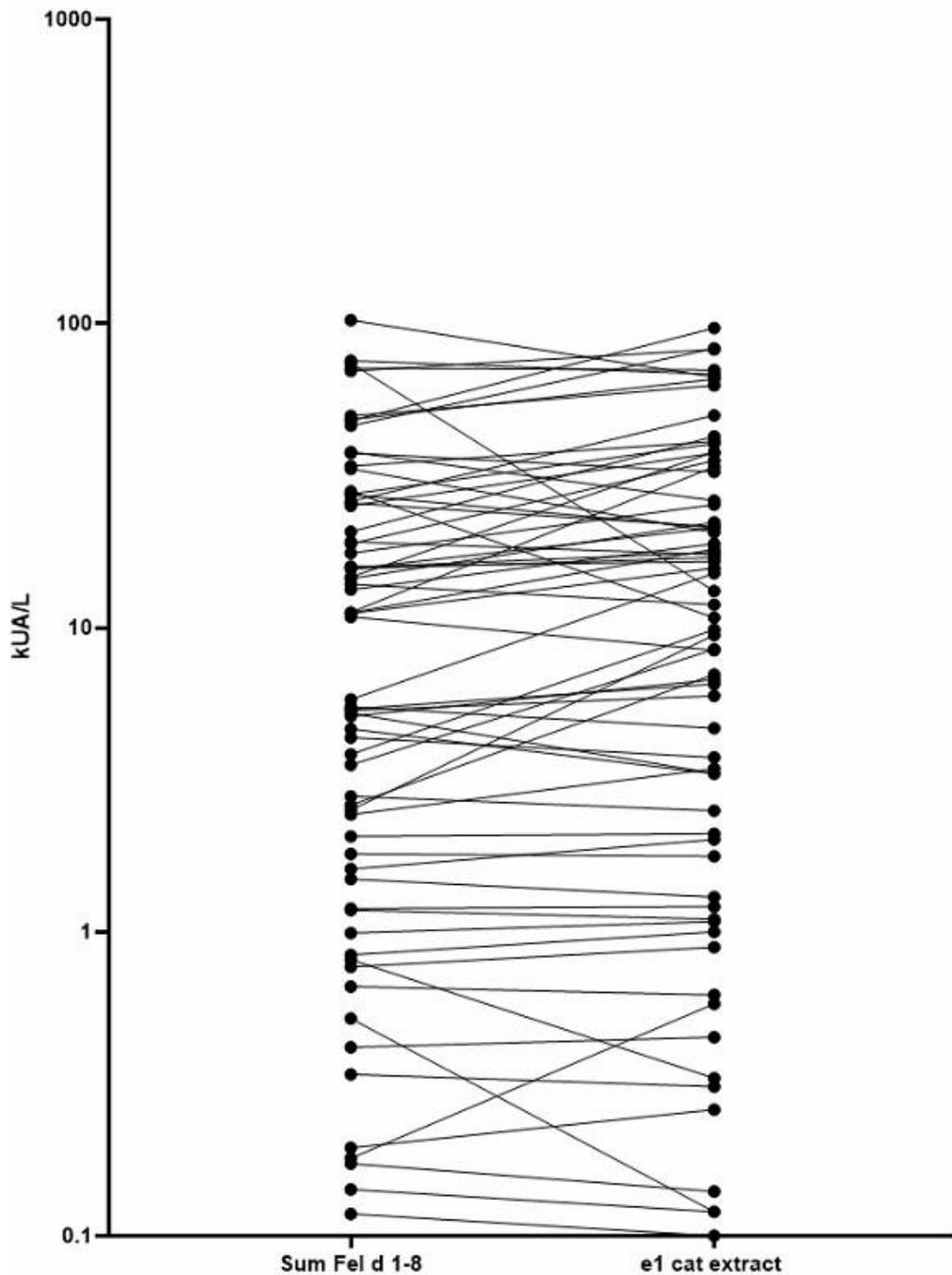


Рисунок 4 – Корреляция между уровнями спец. IgE к экстракту аллергена кошки и сумме Fel d 1–8

По результатам проведенного тестирования было выявлено следующее распределение сенсibilизации к отдельным аллергокомпонентам у пациентов с подтвержденной сенсibilизацией: сенсibilизированным пациента считали по результатам положительных титров к экстракту аллергена кошки, соответственно распространенность составила 100% случаев. Для Fel d 1, который является главным аллергокомпонентом аллергена кошки и наиболее описан, также сохраняется наиболее высокий уровень распространения и составил 97,2 %, для Fel

d 2 – 30,1 %, для Fel d 3 – 50,6 %, для Fel d 4 – 52 %, для Fel d 6 – 32,8 %, для Fel d 7 – 54,7 %, для Fel d 8 – 42,4 %.

Обращает на себя внимание, что большинство аллергокомпонентов имеет высокую распространенность, что приводит к выводу, что Fel d 1 нельзя рассматривать как единственный клинически значимый аллергокомпонент, так как при проведении гипосенсибилизации только к мажорному аллергену мы не достигнем желаемых результатов, а именно снижения выраженности клинических симптомов и/или ремиссии.

Таблица 3 – Серологическая характеристика сенсibilизации пациентов

<b>А</b>							
<b>Экстракт кошачьих аллергенов кU<sub>A</sub>/L сред.</b>	<b>rFel d 1 кU<sub>A</sub>/L сред.</b>	<b>nFel d 2 кU<sub>A</sub>/L сред.</b>	<b>rFel d 3 кU<sub>A</sub>/L сред.</b>	<b>rFel d 4 кU<sub>A</sub>/L сред.</b>	<b>nFel d 6 кU<sub>A</sub>/L сред.</b>	<b>rFel d 7 кU<sub>A</sub>/L сред.</b>	<b>rFel d 8 кU<sub>A</sub>/L сред.</b>
27.06 (0.12–100)	16.94 (0–100)	2.7 (0–100)	2.18 (0–73.8)	5.69 (0–100)	0.82 (0–41.3)	4.53 (0–100)	0.37 (0–8.14)
<b>В</b>							
<b>Экстракт кошачьих аллергенов N %</b>	<b>rFel d 1 N %</b>	<b>nFel d 2 N %</b>	<b>rFel d 3 N %</b>	<b>rFel d 4 N %</b>	<b>nFel d 6 N %</b>	<b>rFel d 7 N %</b>	<b>rFel d 8 N %</b>
N = 73 100%	N = 71 97.2%	N = 22 30.1%	N = 36 50.6%	N = 38 52%	N = 24 32.8%	N = 40 54.7%	N = 32 42.4%

Так как в ходе формирования исследуемой когорты у нас образовалось две большие группы пациентов с результатами проведенных кожных проб и без них, мы дополнительно проанализировали эти данные. Результаты измерения уровней антител IgE, специфичных к экстракту кошачьей перхоти и к семи очищенным молекулам кошачьих аллергенов (проведено в двух группах пациентов), с результатами кожных проб и без них были следующими. Было обнаружено, что 62 из 70 пациентов и 11 из 14 пациентов имели уровни IgE для экстракта кошек выше или равные 0,1 кЕА/л соответственно (таблица 3). Среди 70 пациентов с положительными результатами кожных проб у 62 были обнаружены уровни специфического IgE, превышающие или равные 0,1 кЕА/л по крайней мере для одной из 7 используемых молекул аллергена, тогда как 11 из 14 пациентов без результатов кожных проб были также положительными по крайней мере для одной

из молекул аллергена (таблица 3). Демографические и клинические особенности были сопоставимы с таковыми у 84 пациентов с аллергическими симптомами, связанными с кошками (таблица 3). Кумулятивные уровни IgE, превышающие или равные 0,1 кЕА/л для молекул кошачьих аллергенов, были обнаружены у 75 из 84 пациентов, кто демонстрировал клинические проявления аллергии при контакте с кошкой, что наталкивает нас на мысли о существовании еще не описанных алергокомпонентов аллергена кошки. Достаточно интересным наблюдением является то, что пять пациентов с положительным кожным тестом имели отрицательный результат на уровни IgE, характерные для суммы молекул аллергена (таблица 3), что возвращает нас к проблематике стандартизации и контаминации экстрактов аллергенов, в том числе для диагностических потребностей.

### **3.3. Уровни сенсibilизации к алергокомпонентам кошки и их связь с симптомами**

В таблице 4 показаны уровни IgE, характерные для экстракта кошачьего аллергена и молекул кошачьего аллергена. В таблице 4 представлены средние уровни IgE, специфичные для экстракта перхоти кошки и каждой из семи протестированных молекул аллергена, у 73 пациентов с уровнями IgE, специфичными для кошачьих аллергенов, равными или превышающими 0,1 кЕА/л. Сенсibilизация IgE к Fel d 1 была выявлена у 97,2 % (n = 72) пациентов, средний уровень составил 16,9 кЕА/л (таблица 4).

Таблица 4 – Клинические симптомы и уровни сенсibilизации к алергокомпонентам кошки

ID	Пол	лет	кож. пробы	симптомы				Fel d 1 (kUA/L)	Fel d 2 (kUA/L)	Fel d 3 (kUA/L)	Fel d 4 (kUA/L)	Fel d 6 (kUA/L)	Fel d 7 (kUA/L)	Fel d 8 (kUA/L)	e1 Cat Extract (kUA/L)	Sum Fel d 1-8
				Астма	ринит	конь.	дерм.									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<b>Положительные sIgE к экстракту кошки и/или алергокомпонентам</b>																
1	m	31	+	+	+	-	-	3.1 9	9.22	0.7 4	0.65	0.6 5	1.25	neg	17.7	15.7 9
2	F	25	+	+	+	+	+	57. 2	neg	Neg	neg	0.1 7	neg	neg	100	57.4 9
4	F	35	+	+	+	+	+	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	0.53	0.62	0.61 1
5	m	29	+	-	+	+	+	1.7 6	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	1.77	1.80 3
7	m	24	+	-	+	+	-	5.0 5	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	6.76	5.11 3
8	F	57	+	-	+	+	-	2.5 5	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	7.02	2.61
9	F	27	+	+	+	+	+	8.7 9	0.86	1.2 3	5.37	0.1 5	2.18	0.31	35.4	18.8 9
10	m	29	+	+	+	+	-	0.3 6	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	0.45	0.41 7
11	m	29	+	+	-	+	-	5.2	neg	0.1 2	neg	neg	neg	neg	6.53	5.4
12	F	27	+	-	+	+	-	14. 2	<u>3.7</u>	0.7	2.55	0.9 9	3.42	0.47	49.9	26.0 3
14	m	21	+	+	+	+	+	16. 7	neg	0.5 9	1.78	0.0 19	6.35	0.15	21.5	25.6 8
15	m	19	+	+	+	+	-	100	neg	0.1 4	0.14	0.1 4	90.3	neg	100	>10 0
16	m	19	+	-	+	+	+	0.5 6	0.19	Neg	neg	neg	neg	neg	0.89	0.76 7
17	m	21	+	+	+	+	-	5.4 3	0.78	1.7 9	5.96	0.1 1	neg	0.45	22.2	14.5 2
18	m	20	+	+	+	+	-	1.6	neg	0.5 4	neg	neg	3.03	0.2	4.67	5.49
20	m	18	+	+	+	+	-	29	Neg	2.1	10.1	1.0 7	5.6	0.45	65.7	48.4
21	m	20	+	+	+	+	-	3.1 2	Neg	neg	neg	neg	0.32	neg	8.49	3.54
23	m	23	+	+	+	+	+	13. 2	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	18.9	13.3 4
24	m	22	+	+	+	+	-	2.5 5	Neg	0.7 7	1.59	neg	neg	0.36	5.97	5.34
25	m	20	+	-	+	+	-	42. 4	0.19	18	100	0.1 7	0.17	3.08	100	>10 0

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
26	m	23	+	+	+	+	+	0.6 9	Neg	neg	0.1	neg	neg	neg	1	0.84
27	m	24	+	+	+	+	+	6.4 6	Neg	1.3 5	5.96	0.6 9	neg	0.2	37.8	14.6 8
29	m	22	+	+	+	+	-	0.6 2	Neg	0.3 4	1.94	neg	1.18	0.23	3.74	4.35
30	F	32	+	+	+	+	-	100	100	73. 8	100	41. 3	100	8.14	100	>50 0
31	m	24	+	+	+	+	-	0.2 4	Neg	0.0 8	0.1	0.1	0.11	neg	0.33	0.81
33	F	42	+	-	+	+	-	15. 5	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	17	15.6 3
34	m	41	+	+	+	+	+	100	<u>56.6</u>	6.1 9	11.1	4.9 6	neg	1.19	100	>10 0
35	F	40	+	+	+	+	-	22. 8	Neg	neg	neg	neg	2.19	neg	37.5	25.1 8
36	F	27	+	-	+	+	-	1.7 8	Neg	neg	neg	neg	0.13	neg	2.1	2.06
37	F	39	+	+	+	+	-	100	Neg	0.1 8	neg	0.2 1	2.68	neg	100	>10 0
38	m	28	+	+	+	+	-	15. 6	Neg	0.6 6	1.47	neg	9.53	0.18	40.3	27.4 9
39	F	28	+	+	+	+	-	0.1 2	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	0.58	0.18
40	F	38	+	-	+	+	-	4.5	Neg	1.3 4	2.48	0.1 1	1.92	0.47	8.43	10.8 6
41	F	29	+	-	+	+	-	neg	Neg	neg	neg	neg	0.47	neg	0.12	0.51
42	m	21	+	+	+	+	-	4.7 4	1.97	0.2 7	0.78	neg	3.3	0.1	18.1	11.2 1
43	m	25	+	+	+	-	-	0.2 3	Neg	neg	neg	neg	neg	0	0.31	0.34
45	m	24	+	+	+	+	+	16. 3	8.09	1.8	5.1	0.3 7	5.46	0.64	26.2	37.7 6
46	m	24	+	+	+	+	-	47. 3	neg	neg	neg	neg	2.34	neg	62.6	49.7 5
47	m	21	+	+	+	+	-	2.2 3	neg	neg	neg	neg	0.13	neg	3.44	2.43
48	m	23	+	+	+	-	-	0.1 5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0.26	0.19 5
49	m	18	+	+	+	-	-	10	neg	0.1 2	0.33	0.7 3	neg	neg	33.8	11.2 4
50	m	21	+	+	+	+	-	32. 3	<u>5.6</u>	3.6 1	27.3	1.9 6	neg	0.49	70.3	71.3
51	m	18	+	+	+	+	-	8.7 7	neg	neg	neg	neg	2.3	neg	15.7	11.1 6
52	m	22	+	+	+	-	-	0.1 6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0.14	0.17 3
53	m	20	+	+	+	-	-	1.3 4	0.17	3.5 8	7.54	0.1 6	0.18	0.92	11.9	13.8 9

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
54	m	26	+	+	+	+	+	34. 5	0.19	5.9 8	36.3	neg	23.8	1.74	66.7	102. 6
55	m	22	+	+	+	+	+	62. 8	0.14	0.5 4	5.52	neg	0.52	0.22	82.2	69.8 3
56	m	22	+	+	+	-	-	5.7 7	0.45	0.6 8	7.17	neg	1.52	0.27	16.5	15.9
57	m	25	+	+	+	-	-	24	neg	1.8 2	7.16	0.4	neg	0.53	40.9	34.0 4
58	m	19	+	+	+	+	-	1.5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	2.01	1.61
60	m	20	+	+	+	+	-	0.6 6	<u>0.94</u>	neg	0.12	0.1 1	2.8	neg	3.31	4.65
61	m	18	+	+	+	+	-	0.1 1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0.12	0.14
62	F	27	+	+	+	+	-	21. 1	neg	2.1 7	7.8	neg	5.92	0.44	32.5	37.5 1
63	m	20	+	+	+	+	-	0.7 9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	1.1	1.18
64	m	18	+	+	+	-	-	2.5 6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	2.5	2.79
65	m	20	+	+	+	+	-	16. 3	0.1	0.1	0.36	neg	2.16	neg	17.4	19.7
66	m	18	+	+	+	+	+	45. 2	0.51	neg	0.83	0.4 5	0.83	neg	96.6	47.9 5
67	F	38	+	+	+	+	-	0.7 4	neg	3. 22	1.5	neg	1.5	neg	9.86	3.83
68	m	22	+	+	+	+	-	1.0 3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	1.3	1.49
69	m	23	+	+	+	+	-	42. 1	<u>2.18</u>	neg	neg	0.4 7	neg	1.25	82.8	46.1 3
70	F	28	+	+	+	+	-	8.2 1	neg	1.1 5	2.95	neg	2.95	0.32	21.3	15.6
71	m	26	n d	+	+	+	-	13	neg	1.3 6	6.29	neg	6.29	0.4	21.3	27.3 6
73	m	19	n d	-	+	-	-	17. 5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	25.4	17.5 8
75	m	34	n d	+	+	+	-	2.4 9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	9.46	2.51
78	m	34	n d	-	+	+	+	56. 2	neg	4.4 1	13.1	0.1	13. 1	0.36	13.2	74.1 7
82	F	31	n d	+	+	-	+	47. 9	neg	3.5 1	11.5	neg	11.5	1	68.2	75.5
83	m	33	n d	+	-	+	+	3.2	neg	2	11.1	neg	11.1	0.64	10.8	28.0 8
85	F	47	n d	+	+	+	-	0.8 2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	1.08	0.99
87	F	22	n d	+	+	+	-	13. 7	neg	0.5 1	3.12	neg	3.12	0.15	42.5	20.6 6
88	F	52	n d	+	+	+	+	0.1 5	1.99	neg	neg	2.6 1	0.36	neg	3.32	5.23

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
91	F	22	nd	-	+	+	-	3.08	2.06	neg	neg	0.42	neg	neg	15.1	15.1
95	F	52	nd	+	-	-	-	1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	1.21	1.19
96	F	22	nd	-	+	+	+	5.97	0.21	12.4	7.02	0.07	7.02	0.6	20.6	33.29
<b>сумма sIgE к алергокомпонентам равна или больше 0.1 кUA/L</b>																
13	m	20	+	+	+	+	-	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	nd	0.115
59	m	21	+	+	+	+	-	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	nd	0.11
<b>отрицательные sIgE</b>																
3	F	29	+	-	+	+	-	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	nd	neg
19	m	18	+	+	+	+	-	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	nd	neg
22	m	18	+	+	+	+	-	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	nd	neg
28	m	24	+	+	+	-	-	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	nd	neg
32	f	62	nd	+	+	+	+	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	nd	neg
44	m	53	+	+	+	+	-	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	nd	neg
72	f	27	nd	-	+	-	-	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	nd	neg
80	f	34	nd	+	+	+	-	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	nd	neg
84	m	28	nd	+	+	+	-	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	nd	neg

Примечание. 1-2 симптома –  ; 3 симптома –  ; 4 симптома –  .

Таким образом, согласно установленному пороговому уровню, 2 из 73 пациентов (то есть пациенты 4 и 41) были идентифицированы как отрицательные к rFel d 1, но у них была обнаружена IgE-реактивность к другим молекулам кошачьего аллергена (таблица 4). nFel d 2-специфический IgE был обнаружен у 30,1 % пациентов (n = 22) при среднем уровне 2,7 кЕА/л. rFel d 3-специфический IgE был обнаружен у 50,6 % пациентов (n = 36) при среднем уровне 2,18 кЕА/л. rFel d 4-специфический IgE был обнаружен у 52 % пациентов (n = 38) со средним уровнем 5,69 кЕА/л. nFel d 6-специфический IgE был обнаружен у 32,8 % пациентов (n = 24) при среднем уровне IgE 0,82 кЕА/л. rFel d 7-специфический IgE

был обнаружен у 54,7 % пациентов ( $n = 40$ ) при среднем уровне 4,53 кЕА/л. rFel d 8-специфический IgE был обнаружен у 42,4 % пациентов ( $n = 32$ ) при среднем уровне 0,37 кУА/л (таблица 4).

Три молекулы аллергена распознавались более чем 50 % пациентов в нашей популяции (то есть rFel d 3, rFel d 4 и rFel d 7). Соответственно, они могут рассматриваться как основные аллергены. После rFel d 1 аллерген-специфические средние уровни IgE были самыми высокими в следующем порядке: rFel d 4 > rFel d 7 > nFel d 2 > rFel d 3 > nFel d 6 > rFel d 8 (таблица 4). Корреляция кумулятивной суммы уровней IgE, специфичных для молекул аллергена, с уровнями IgE, специфичными для экстракта

Совокупные уровни аллерген-специфических IgE (то есть сумма уровней IgE, специфических для этих семи протестированных молекул аллергена) в значительной степени коррелировали с уровнями IgE, специфичными для экстракта аллергена кошачьих, что указывает на то, что семь молекул аллергена можно использовать вместо экстракта аллергена кошки для измерения аллергенности. специфические уровни IgE (рисунок 4). Уровни специфического IgE были сопоставимы для экстракта аллергена кошки и суммы молекул аллергена для большинства пациентов; однако у некоторых пациентов были обнаружены более высокие уровни IgE, характерные для экстракта кошачьего аллергена, чем для молекул кошачьего аллергена, или наоборот (рисунок 4). Интересно, что при рассмотрении кумулятивных уровней IgE, превышающих или равных 0,1 кЕА/л для суммы молекул аллергена, аллерген-специфическая IgE-реактивность кошек была обнаружена у 75 из 84 пациентов с аллергическими симптомами, связанными с кошками. Таким образом, с молекулами аллергена было выявлено на двоих больше пациентов, чем с экстрактом кошачьего аллергена (таблица 3). Однако у 9 из 84 пациентов с аллергическими симптомами, связанными с кошками, не было обнаружено специфических кошачьих аллергенов IgE (таблица 4). У пяти из девяти пациентов был проведен кожный прик-тест с экстрактом кошачьего аллергена, который дал положительные результаты. У четырех пациентов кожные пробы не проводились, но были зарегистрированы аллергические симптомы, связанные с контактом с кошкой (таблица 4).

### 3.4. Связь симптомов и фенотипов аллергии на кошек с профилями распознавания молекулярных IgE и кумулятивными уровнями аллерген-специфических IgE

На рисунках 5 и 6 показана частота IgE и уровни IgE, специфического для аллергена, для каждой из протестированных молекул кошачьего аллергена у пациентов с кошачьим ринитом, астмой и дерматитом. У пациентов с кошачьими кожными симптомами была выявлена тенденция к более высокому уровню IgE и/или более выраженная сенсibilизация к каждой из протестированных молекул аллергена по сравнению с пациентами, страдающими ринитом или астмой, в то время как между пациентами с ринитом и астмой не было явных различий.

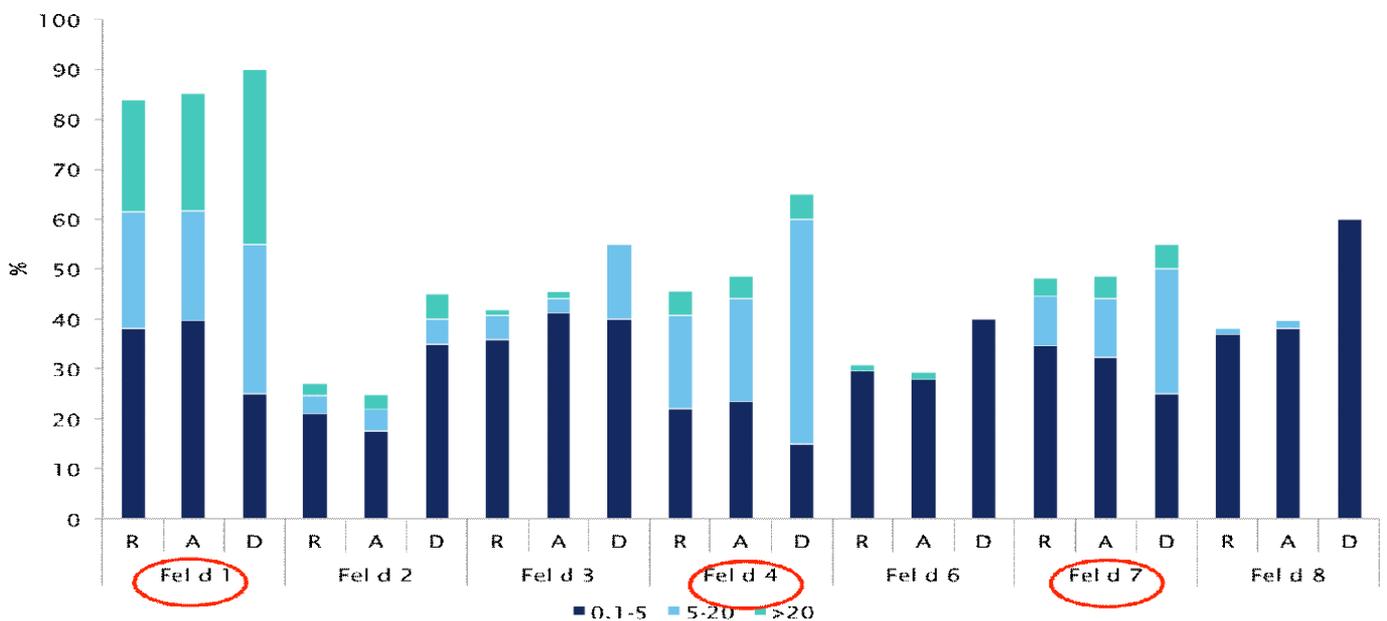


Рисунок 5 – Уровни asIgE к 8 аллергенам кошек у пациентов с различными симптомами аллергии (ринит R, бронхиальная астма A, кожные проявления D)

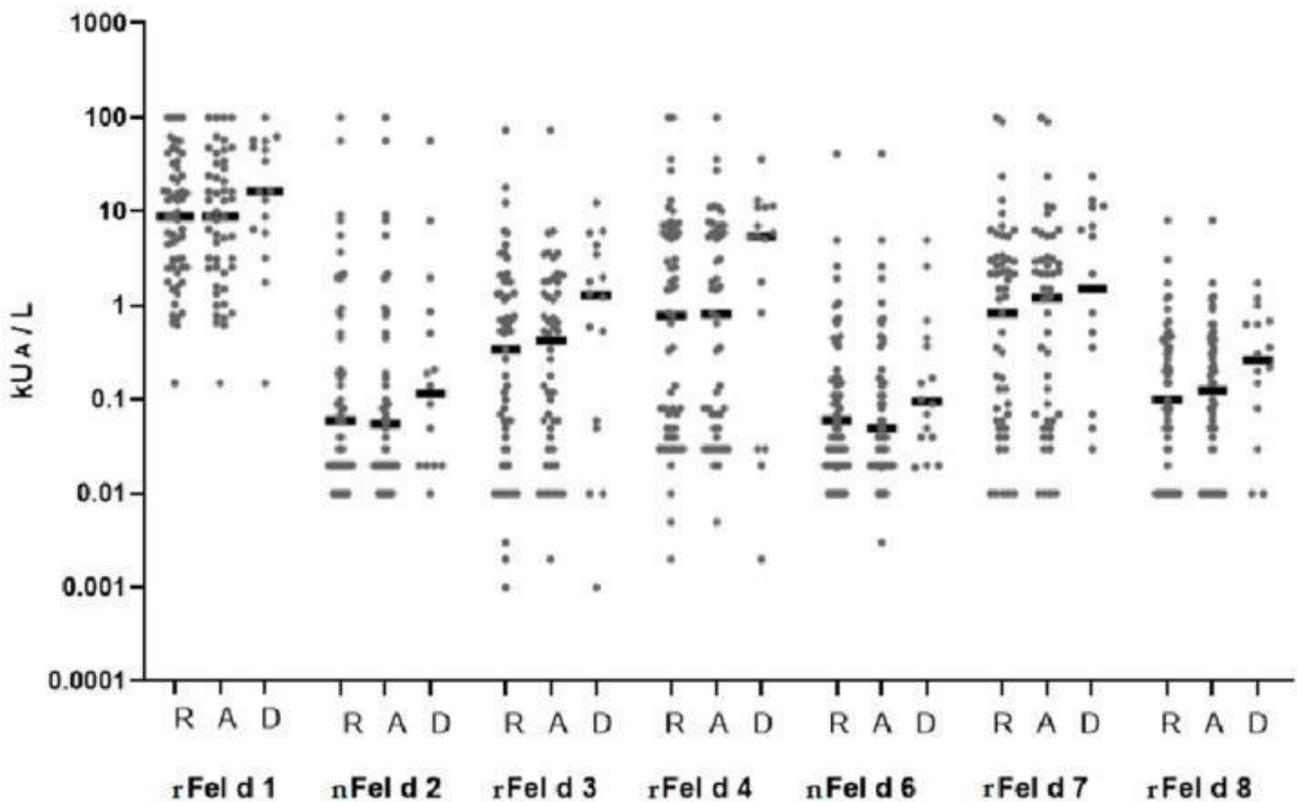


Рисунок 6 – Уровни IgE (ось ординат: сенсibilизация, измеренная в kUA/L; средние уровни IgE указаны горизонтальными полосами), специфичные для молекул аллергенов кошек (Fel d 1–Fel d 8) у пациентов с различными симптомами аллергии на кошек (R: ринит; A: астма; D: дерматит)

В исследовании также была исследована связь между профилями распознавания молекулярных аллерген-специфических IgE, кумулятивными уровнями аллерген-специфических IgE и различными фенотипами аллергии на кошек, определяемыми количеством различных аллергических симптомов. В исследование было включено 73 пациента с уровнем специфических IgE антител  $>0,1$  кЕД А /л. В таблице 4 показано, что 21 пациент страдал от 1–2 симптомов аллергии на кошек, 39 пациентов страдали от 3 различных симптомов аллергии на кошек и 13 пациентов страдали от 4 различных симптомов аллергии на кошек. Среднее количество распознанных аллергенов у пациентов с 1–2 симптомами составило 3,2, в то время как среднее количество распознанных аллергенов у пациентов с 3 симптомами составило 3,82. Наконец, среднее количество распознанных аллергенов у пациентов с 4 симптомами составило 4,38. Хотя различия не были значительными, отображенные данные на рисунке 7 предполагают, что большее количество распознанных молекул аллергена было

связано с большим количеством различных аллергических симптомов.

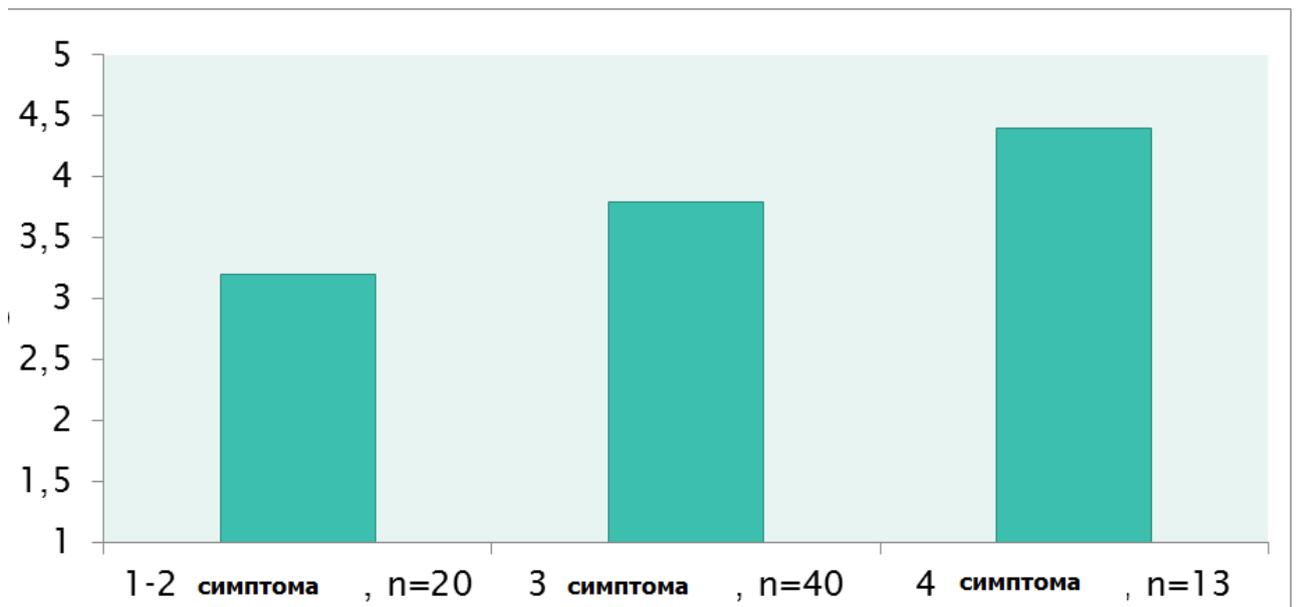


Рисунок 7 – Оценка уровня sIgE у пациентов, имеющих разное количество клинических симптомов

В дополнение к результатам, представленным на рисунке 7, мы также сравнили сумму уровней IgE, специфичных для молекул аллергена, уровней IgE, специфичных для экстракта аллергена кошки, и уровней IgE, специфичных для rFel d 1, у пациентов с разным количеством аллергических симптомов. Сравнение показало, что уровни аллерген-специфического IgE были значительно выше у пациентов с четырьмя симптомами по сравнению с пациентами с 1–2 симптомами (рисунок 8). Это различие было более выраженным для суммарного количества уровней IgE, специфичных для молекул аллергена и кошачьего экстракта, чем для уровней IgE, специфичных только для rFel d 1. Эти данные свидетельствуют о том, что кумулятивные уровни IgE к различным аллергенам кошек могут быть связаны с тяжестью симптомов аллергии на кошек.

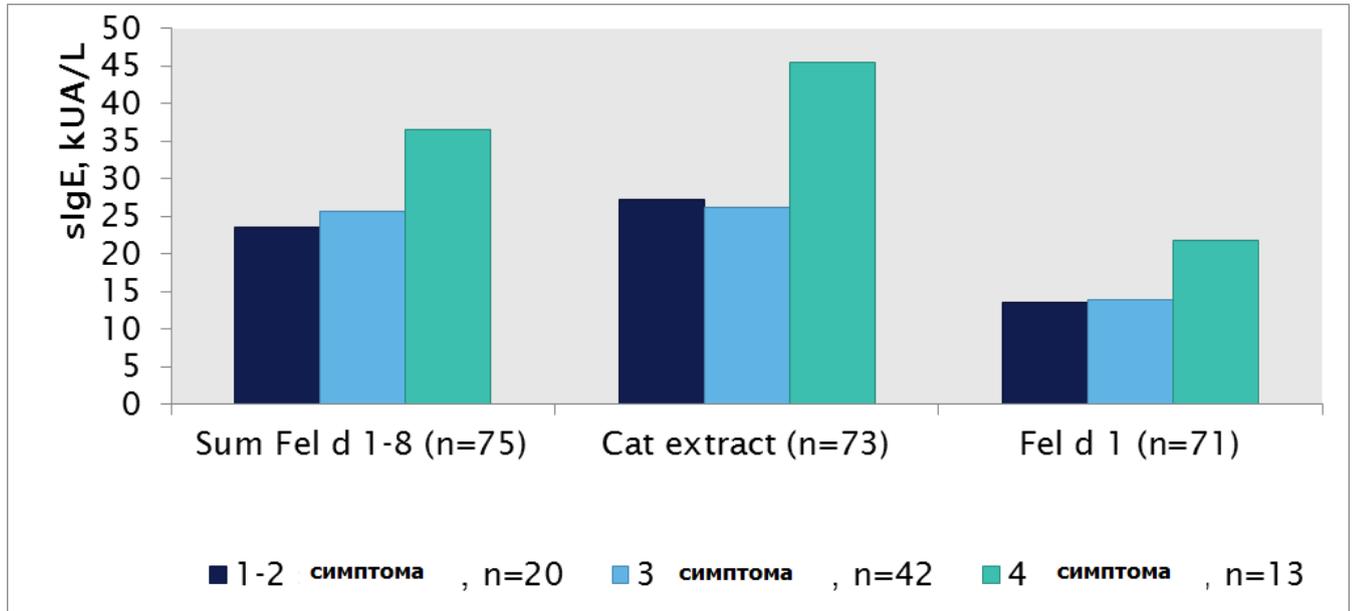


Рисунок 8 – Уровни sIgE к сумме Fel d 1–8, экстракту аллергена кошки и Fel d 1 у пациентов с разным количеством симптомов

#	sex	age	Cat allergy				Other allergy					Fel d 1	Fel d 2	Fel d 3	Fel d 4	Fel d 6	Fel d 7	Fel d 8	e204	f2	fx5
			A	R	C	D	dust	pet	pollen	food	mold										
1	m	31	+	+	-	-	-	+	nd	nd	-	3,19	<b>9,22</b>	0,74	0,65	0,65	1,25	0,09	0,04	0,06	neg
9	f	27	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	8,79	<b>0,86</b>	1,23	5,37	0,15	2,18	0,31	0,06	0,07	neg
12	f	27	-	+	+	-	-	+	+	nd	nd	14,2	<b>3,7</b>	0,7	2,55	0,99	3,42	0,47	0,15	<b>1,36</b>	pos
17	m	21	-	+	+	-	+	+	+	nd	nd	5,43	<b>0,78</b>	1,79	5,96	0,11	0	0,45	0	0,06	neg
30	f	32	+	+	+	-	+	+	+	nd	nd	>100	<b>&gt;100</b>	73,8	>100	41,3	>100	8,14	<b>19,1</b>	<b>15,1</b>	pos
34	m	41	+	+	+	+	+	+	-	nd	nd	>100	<b>56,6</b>	6,19	11,1	4,96	0,03	1,19	<b>7,43</b>	<b>3,53</b>	pos
42	m	21	+	+	+	-	+	+	+	nd	nd	4,74	<b>1,97</b>	0,27	0,78	0,05	3,3	0,1	<b>0,7</b>	<b>0,38</b>	neg
45	m	24	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	16,3	<b>8,09</b>	1,8	5,1	0,37	5,46	0,64	<b>2,59</b>	<b>2,52</b>	pos
50	m	21	+	+	+	-	+	+	+	nd	nd	32,3	<b>5,6</b>	3,61	27,3	1,96	0,04	0,49	0,28	<b>0,38</b>	neg
56	m	22	+	+	-	-	+	+	+	+	nd	5,77	<b>0,45</b>	0,68	7,17	0,04	1,52	0,27	0,01	0,18	neg
60	m	20	+	+	+	-	+	+	+	nd	nd	0,66	<b>0,94</b>	0,01	0,12	0,11	2,8	0,01	0,05	0,03	neg
66	m	18	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	45,2	<b>0,51</b>	0,05	0,83	0,45	0,83	0,08	0	0,01	neg
69	m	23	+	+	+	-	+	+	+	nd	nd	42,1	<b>2,18</b>	0,03	0,05	0,47	0,05	1,25	0,03	0,05	neg
88	f	52	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	0,15	<b>1,99</b>	0,06	0,03	2,61	0,36	0,03	0,24	<b>2,17</b>	pos
91	f	22	-	+	+	-	+	+	nd	nd	nd	3,08	<b>2,06</b>	0,08	0,08	0,42	0,08	0,01	0,07	0,14	neg

Рисунок 9 – Пациенты с аллергией на кошку, имеющие сенсibilизацию к Fel d 2 (кошачий альбумин), проявляют бессимптомную IgE-специфическую реактивность на молоко из-за перекрестной реактивности с Bos d 6 (BSA, бычий сывороточный альбумин)

Другой интересной находкой стала высокая перекрестная активность между альбумином сыворотки крови кошки и альбумином кошачьего молока. Пациенты, продемонстрировавшие в ходе детекции сенсibilизации повышенные уровни IgE, специфических к Fel d 2 и Bos d 6, не имели клинических симптомов реакций гиперчувствительности при употреблении в пищу молока. С учетом того, что f2 используется в коммерческой практике в лабораториях, в рутинной практике это

может приводить к ненужным ограничениям в питании. Молочные продукты являются крайне ценным кластером в питании, и исключение данного класса продуктов, особенно в детском возрасте, может приводить к нежелательным последствиям.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Насколько известно, это первое исследование, в котором определены профили реактивности IgE и уровни IgE, характерные для полной панели очищенных молекул кошачьих аллергенов (то есть rFel d 1, nFel d 2, rFel d 3, rFel d 4, rFel d 7 и rFel d 8), а также перекрестно-реактивные углеводные эпитопы, представленные nFel d 6, в клинически хорошо охарактеризованной группе взрослых пациентов с аллергией на кошек. Было получено несколько соответствующих результатов. Во-первых, обнаружено, что панель протестированных молекул аллергена, по-видимому, эквивалентна большинству эпитопов IgE, присутствующих в экстрактах природных кошачьих аллергенов. Этот аспект был изучен путем количественного определения кумулятивной суммы концентраций IgE, специфичных для молекулы аллергена кошки, и путем сравнения ее с уровнями IgE, специфичными для экстракта аллергена, с использованием тест-системы, позволяющей проводить их количественную оценку, то есть системы ImmunoCAP. Обнаружена значительная и высокая корреляция между кумулятивной суммой аллерген-специфических IgE и аллерген-специфических IgE, что указывает на то, что молекулы аллергена действительно напоминают большую часть репертуара эпитопов IgE природного источника аллергена. Однако в этом контексте следует отметить, что специфическая IgE-реактивность не может быть обнаружена у всех пациентов с аллергическими симптомами, связанными с кошками. Есть несколько возможных объяснений этого открытия. Первая возможность состоит в том, что существуют дополнительные, еще не открытые молекулы аллергенов, которые не представлены панелью молекул аллергенов. Однако тот факт, что у двух пациентов с отрицательным результатом на экстракт аллергена была обнаружена реактивность IgE к сумме молекул аллергена, говорит против этой возможности (таблица 4). Также возможно, что аллерген-специфическая реактивность IgE ниже 0,1 кЕА/л может вызывать клинически значимую сенсибилизацию. Наконец, возможно, что у некоторых пациентов аллерген-специфические IgE-антитела в основном связаны с

эффекторными клетками через IgE-рецепторы и, таким образом, не могут быть обнаружены с помощью IgE-серологии. Это объяснение не является маловероятным, поскольку у всех пациентов, у которых были проведены кожные пробы без аллерген-специфического IgE в сыворотке, были выявлены положительные кожные реакции.

Определение профилей молекулярной реактивности IgE проводилось в репрезентативной когорте клинически хорошо охарактеризованных пациентов, у которых симптомы аллергии, связанные с кошками, были тщательно зарегистрированы в анамнезе, чтобы их можно было окончательно отнести к контакту с кошкой. Однозначно продемонстрировано, что, помимо основного кошачьего аллергена, rFel d 1, который был распознан у 97 % пациентов с аллергией на кошек, важны и другие молекулы кошачьего аллергена. rFel d 3, rFel d 4 и rFel d 7 распознавались антителами IgE более чем у 50 % исследуемой популяции; следовательно, их следует рассматривать как основные или средние аллергены в зависимости от частоты распознавания IgE. Понятно, что измерения только аллерген-специфической реактивности IgE недостаточно, чтобы продемонстрировать клиническую значимость дополнительных молекул аллергена у пациентов с аллергией на кошек; тем не менее это открытие подчеркивает важность глубокого изучения вклада аллергенов, отличных от Fel d 1, в симптомы аллергии на кошек с помощью провокационных тестов или, по крайней мере, путем изучения их аллергенной активности в суррогатных тестах на аллергическое воспаление с использованием свежесобранных образцов крови для тестирования активации базофилов. Данное исследование, однако, предоставляет косвенные доказательства того, что молекулы аллергена, отличные от Fel d 1, являются клинически важными, поскольку мы обнаружили, что значимость корреляции уровней IgE, характерных для суммы молекул аллергена, со сложными фенотипами аллергии на кошек была выше, чем у Fel d 1-специфические уровни IgE. Кроме того, отмечается тенденция к более высоким уровням IgE для аллергенов, отличных от rFel d 1, у пациентов с симптомами дерматита.

Таким образом, это исследование показывает, что, помимо rFel d 1, важными аллергенами кошек следует считать rFel d 3, rFel d 4 и rFel d 7. Соответственно,

будет важно учитывать дополнительные кошачьи аллергены для аллерген-специфического лечения с помощью АСИТ или терапии пассивной иммунизации при аллергии на кошек. Кроме того, это исследование демонстрирует важность диагностики молекулярного IgE при аллергии на кошек и указывает на то, что кумулятивная сумма кошачьих аллерген-специфических IgE может быть биомаркером для выявления пациентов со сложными фенотипами аллергии на кошек. Таким образом, эти результаты важны для молекулярной диагностики сенсibilизации IgE к кошкам и разработки специфической молекулярной иммунотерапии для лечения и профилактики аллергии на кошек.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведено исследование, в котором проанализированы профили реактивности IgE и уровни IgE, специфичные для полного набора очищенных молекул кошачьих аллергенов (таких как rFel d 1, nFel d 2, rFel d 3, rFel d 4, rFel d 7 и rFel d 8), а также перекрестно-реактивные углеводные эпитопы, представленные nFel d 6, в клинически детально описанной группе взрослых пациентов с аллергией на кошек. Результаты исследования показали несколько важных аспектов. Во-первых, выявлено, что исследованные молекулы аллергенов охватывают большинство эпитопов IgE, содержащихся в экстрактах природных кошачьих аллергенов. Это было подтверждено количественным анализом совокупной концентрации аллерген-специфических IgE и их сравнением с уровнями IgE, специфичными для экстракта аллергена, с использованием системы ImmunoCAP. Установлена высокая корреляция между этими показателями, что подтверждает, что молекулы аллергенов представляют большую часть репертуара IgE-эпитопов природного аллергена.

Однако не у всех пациентов с симптомами аллергии на кошек выявлена специфическая IgE-реактивность. Это может объясняться несколькими причинами. Возможно, существуют неизвестные молекулы аллергенов, не включенные в изучаемую панель, хотя реактивность IgE у некоторых пациентов с отрицательным результатом на экстракт аллергенов это опровергает. Также есть вероятность, что клинически значимая сенсibilизация может возникать при уровнях аллерген-специфических IgE ниже 0,1 кЕА/л. Другим объяснением может быть связывание IgE с эффекторными клетками через рецепторы, что затрудняет их обнаружение с помощью стандартных серологических методов.

Исследование проводилось на репрезентативной группе пациентов, у которых аллергия на кошек была подтверждена клиническими данными. Показано, что помимо основного аллергена rFel d 1, важны и другие молекулы, такие как rFel d 3, rFel d 4 и rFel d 7, распознаваемые более чем у половины пациентов. Это подчеркивает необходимость учета этих аллергенов при

разработке аллерген-специфических методов лечения, таких как АСИТ или пассивная иммунизация.

Таким образом, результаты исследования демонстрируют, что rFel d 3, rFel d 4 и rFel d 7 также играют важную роль в аллергии на кошек. Это исследование подтверждает значимость молекулярной диагностики IgE при аллергии на кошек и указывает на потенциал кумулятивной суммы аллерген-специфических IgE как биомаркера для выявления пациентов с более сложными формами аллергии. Эти выводы могут быть использованы для разработки новых методов диагностики и лечения аллергии на кошек, включая молекулярную иммунотерапию.

## ВЫВОДЫ

1) Наше исследование показало, что аллергены Fel d 4 и Fel d 7 в дополнение к rFel d 1 важны и должны учитываться для молекулярной диагностики и разработки молекулярных форм аллерген-специфического лечения.

2) Было продемонстрировано, что панель кошачьих аллергенов, состоящая из rFel d 1, nFel d 2, rFel d 3, rFel d 4, nFel d 6, rFel d 7 и rFel d 8, напоминала эпитопы IgE источника аллергена. Сумма кумулятивных уровней IgE, специфичных для молекул аллергена, лучше всего коррелировала с различными фенотипами, при этом более высокие уровни указывали на большее количество симптомов.

3) Также результаты нашего исследования показывают, что использование панели молекулярных аллергенов демонстрируют более высокую специфичность.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

С пациентами с аллергопатологией сталкиваются как узкие специалисты, так и врачи общей практики. Данная патология является социально значимой и накладывает определенные ограничения не только на повседневную жизнь пациента, но и на диагностические и лечебные процедуры.

Существуют диагностические проблемы, связанные в первую очередь с кросс-реактивностью аллергенов, как было продемонстрировано в части работы с альбумином кошки и белком коровьего молока. В клинической практике это могло привести к наложению ограничений в питании, что особенно актуально в детском возрасте, когда питание должно быть максимально разнообразным.

Использование молекулярных методов диагностики позволяет решить проблему кросс-реактивности и контаминации, а соответственно, недостоверных результатов.

АСИТ вот уже на протяжении более чем 100 лет остается единственным методом патогенетического лечения аллергии. Использование молекулярных аллергенов позволяет не только решить проблему стандартизации и контаминации препаратов (а значит, и нежелательной первичной сенсибилизации), но и обеспечить индивидуальный подход к пациенту.

Однако для использования молекулярных аллергенов необходимо иметь полную информацию об их характеристиках и распространенности, данная работа в значительной мере расширяет наши знания об аллергенах кошки и не только позволит в дальнейшем повысить уровень осведомленности об эпидермальной аллергии, но и может послужить базой для усовершенствования диагностических методов и лечебных протоколов.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АСИТ	– аллерген-специфическая иммунотерапия;
PBS (Phosphate- 0Buffered Saline; фосфáтно-солево́й бу́фер)	– буферный раствор, являющийся водным раствором солей, содержащим хлорид натрия, гидрофосфат натрия, хлорид калия и дигидрофосфат калия;
LD, Ld50	– количество микроорганизмов (бактерий, вирусов), вызывающих гибель 50% зараженных животных;
ЭДТА (этилендиамин- тетрауксусная кислота)	– это хелатирующий агент, который используется в клинической практике для удаления ионов металлов из крови;
Аллергокомпо- нент	– молекула (например, белок или гликопротеин) из данного источника аллергенов, выявляемая антителами изотипа IgE (далее – аллерген). Аллергены можно выделить из природных источников аллергенов (нативные, очищенные аллергены) или получить с помощью технологии рекомбинантных ДНК (рекомбинантные аллергены).
Рекомбинантный	– аллергенная молекула, полученная с помощью технологий клонирования ДНК и очистки белков. Рекомбинантные аллергены можно получить в необходимых количествах и в требуемые сроки без CCD-структур. Экстракты аллергенов нельзя получить с помощью рекомбинантных технологий;
Косенсибили- зация	– истинная сенсibilизация к более чем одному источнику аллергенов (например, тимофеевке и березе), которая возникает не из-за перекрестной реактивности;

Полисенсibilизация	– сенсibilизация к трем или более источникам аллергенов (например, клещам, березе и пыльце трав);
Мажорные (главные) триггеры	– аллергены, которые связываются с IgE у 50 % и более пациентов с одинаковой аллергией;
Минорные триггеры	– это антигены, которые вызывают слабую или незначительную иммунную реакцию в организме в отсутствии других антигенов-триггеров;
GA2LEN (Global Allergy and Asthma European Network)	– консорциум ведущих научных центров, занимающихся проблемами аллергий и астмы;
Гиперчувствительность	– это свойство организма отвечать объективно воспроизводимыми симптомами или признаками в ответ на экспозицию определенных раздражителей в дозах, к которым невосприимчивы здоровые;
Hypersensitivity	– objectively reproducible symptoms or signs initiated by exposure to a defined stimulus at a dose tolerated by normal persons ( <a href="https://sci-hub.ru/10.1016/j.jaci.2003.12.591">https://sci-hub.ru/10.1016/j.jaci.2003.12.591</a> );
Аллергокомпонент	– отдельный белок высокой чистоты, выделенный из аллергенного источника или синтезированный при помощи молекулярно-биологических технологий;
Экспрессия	– экспрессия генов, процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт – РНК или белок;
Причинно-значимая сенсibilизация	– это процесс развития специфической иммунной реакции на определенный антиген (сенсibilизация), который в свою очередь приводит к возникновению патологического состояния у человека;

Экспозиция	– контакт иммунной системы организма с антигеном или другими стимулами, которые могут привести к активации иммунного ответа;
Сенсибилизирующий профиль	– вся совокупность аллергенов, к которым чувствителен субъект;
IUIS	– International Union of Immunological Societies;
ECI	– The European Congress of Immunology;
Генно-инженерный метод	– это современная область биотехнологических исследований, направленная на получение организмов с новыми заданными свойствами посредством рекомбинаций молекул ДНК;
Антиген	– обычно чужеродное вещество, которое распознается иммунной системой и связывается с рецепторами Т- и В-клеток;
Аллергологи-ческий чип	– технология, используемая в иммунологии для одновременного измерения наличия и уровня множества различных аллерген-специфических IgE-антител в одном образце крови;
ImmunoCAP ISAC (Immuno-Solid phase Allergen Chip – аллергочипы на твердой фазе)	– это первый мультиплексный тест для <i>in vitro</i> диагностики аллергии, основанный исключительно на аллергокомпонентах (молекулярная аллергодиагностика). Аллергочип позволяет получить результаты определения IgE-антител для фиксированной панели из 112 аллергокомпонентов (из 51 источника) за одно исследование;
MeDALL (Mechanisms of the Development of Allergy)	– это европейский исследовательский проект, целью которого является улучшение понимания механизмов, лежащих в основе аллергических заболеваний;

- BAMSE**  
(Barn/Children,  
Allergy, Milieu,  
Stockholm,  
Epidemiology)
- шведский исследовательский проект, изучающий развитие астмы и аллергии у детей;
- ВОЗ**
- специализированное учреждение Организации Объединенных Наций, состоящее из 194 государств-членов, основная функция которого лежит в решении международных проблем здравоохранения населения Земли;
- Сывороточный альбумин**
- основной белковый компонент плазмы крови, играющий важное значение в поддержании осмотического давления крови и транспорте различных веществ, таких как жирные кислоты, гормоны и лекарства;
- Секретоглобулин**
- это семейство небольших секретируемых белков, которые участвуют в различных физиологических процессах, включая иммунную регуляцию, воспаление и восстановление тканей;
- Цистатин**
- это семейство небольших, богатых цистеином белков, которые участвуют в регуляции активности протеаз в различных биологических процессах, включая иммунную защиту, ремоделирование тканей и апоптоз;
- Липокалин**
- семейство небольших внеклеточных белков, которые участвуют в широком спектре биологических процессов, включая иммунную защиту, транспорт железа, связывание одорантов и феромонов, а также передачу клеточных сигналов;

Латерин-подобный белок	– белок, секретируемый преимущественно в потовых и сальных железах. Функция на данный момент еще неясна;
Элиминация	– процесс исключения;
Эмулирующие эпитопы	– тип эпитопа, который имитирует другой эпитоп, обычно тот, который является частью патогена или аутоантигена. Эмулирующие эпитопы можно создавать искусственно и использовать в качестве вакцин или иммунотерапевтических средств для индуцирования иммунного ответа против патогена или собственного антигена;
Стандартизация аллергенов	– процесс установления стандартизированного и воспроизводимого источника экстракта аллергена, а также установление набора эталонных единиц для измерения активности аллергена;
Пептид	– короткая цепь аминокислот, которая может связываться с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) и распознаваться Т-клетками;
ATS/ERS	– American Thoracic Society/European Respiratory Society;
GINA	– Global Initiative for Asthma;
Супернатант	– жидкая фаза, остающаяся после того, как нерастворимые вещества осаждаются в процессе центрифугирования или осаждения;
Аффинная хроматография	– это метод отделения биомолекулы от смеси, основанный на высокоспецифичном макромолекулярном связывающем взаимодействии между биомолекулой и другим веществом;

- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – иммуноферментный анализ;
- ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) – широко используемый хромогенный субстрат в иммунологических и биохимических анализах, особенно при измерении активности пероксидазы;
- $\alpha$ -Gal – альфа-галактоза, представляет собой углеводную молекулу, обнаруженную у многих млекопитающих, не являющихся приматами, и в некоторых пищевых продуктах, полученных от этих животных. В иммунологии он представляет особый интерес из-за способности индуцировать у человека иммунный ответ, приводящий к развитию аллергии на красное мясо и другие продукты, содержащие  $\alpha$ -Gal.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Использование масс–спектрометрии в стандартизации препаратов аллергенов / В. В. Смирнов, А. А. Игнатов, В. Н. Кузина [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2016. – Т. 16. – № 3. – С. 166–171.
2. Проблема контроля и стандартизации аллерговакцин / В.Н. Федосеева, В.А. Камышева, С.А. Кравченко [и др.] // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2010. – Т. 1. – № 37. – С. 35–38.
3. Современная концепция молекулярной диагностики аллергии на собак / Е.М. Козлов, А.А. Дубовец, К.А. Рябова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – № 175(6). – С. 664–669.
4. Хаитов, Р.М. Иммунология : учебник для студентов мед. вузов / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатъева. – Москва : Медицина, 2002. – 2–е изд., перераб. и доп. – 533 с.
5. Характеристика аллергенов кошки / К.А. Рябова, Е.М. Козлов, Д. Трифонова [и др.] // Иммунология. – 2023. – Т. 44. – № 3. – С. 368–378.
6. A Systematic Review of Clinical Practice Guidelines for Infectious and Non–infectious Conjunctivitis / V. F. Chan, A. C. Yong, A. Azuara–Blanco [et al.] // Ophthalmic Epidemiology. – 2022. – Vol. 29. – № 5. – P. 473–482.
7. A WAO – ARIA – GA2LEN consensus document on molecular–based allergy diagnosis (PAMD@): Update 2020 / I. J. Ansotegui, G. Melioli, G. W. Canonica, [et al.] // World Allergy Organization Journal. – 2020. – Vol. 13. – № 2. – P. 100091.
8. Adolescents’ awareness of HPV infections and attitudes towards HPV vaccination 3 years following the introduction of the HPV vaccine in Hungary / E. Marek, T. Dergez, G. Rebek–Nagy, [et al.] // Vaccine. – 2011. – Т. 29. – № 47. – Pp. 8591–8598.
9. Advances in allergen–microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: The MeDALL allergen–chip / C. Lupinek, E. Wollmann, A. Baar, [et al.] // Methods. – 2014. – Vol. 66. – № 1. – P. 106–119.
10. Agache, I. EAACI guidelines on allergen immunotherapy – Out with the old and in with the new / Agache, I. // Allergy. – 2018. – Vol. 73. – № 4. – P. 737–738.

11. Ahluwalia, S. K. Indoor Environmental Interventions for Furry Pet Allergens, Pest Allergens, and Mold: Looking to the Future / S. K. Ahluwalia // *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. – 2018. – Vol. 6. – № 1. – P. 9–19.
12. Albumins represent highly cross-reactive animal allergens / Z. Liu, D. Trifonova, K. Riabova, [et al.] // *Frontiers Immunology*. – 2023. – № 14. – P. 1241518.
13. Allergen Extracts for In Vivo Diagnosis and Treatment of Allergy: Is There a Future? / R. Valenta, A. Karaulov, V. Niederberger [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology: Practice*. – 2018. – Vol. 6. – № 6. – P. 1845–1855.
14. Allergenic Activity of Individual Cat Allergen Molecules / D. Trifonova, C. Mirela, K. Riabova, [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – № 23. – P. 16729.
15. Allergy and asthma: Effects of the exposure to particulate matter and biological allergens / S. Baldacci, S. Maio, S. Cerrai [et al.] // *Respiratory Medicine*. – 2015. – Vol. 109. – № 9. – P. 1089–1104.
16. Allergy to furry animals: New insights, diagnostic approaches, and challenges / J. R. Konradsen, T. Fujisawa, M. van Hage, [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2015. – Vol. 135. – № 3. – P. 616–625.
17. Amino acid sequence of Fel dI, the major allergen of the domestic cat: protein sequence analysis and cDNA cloning / J. P. Morgenstern, I. J. Griffith, A. W. Brauer, [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1991. – Vol. 88. – № 21. – P. 9690–9694.
18. An update on molecular cat allergens: Fel d 1 and what else? Chapter 1: Fel d 1, the major cat allergen / B. Bonnet, K. Messaoudi, F. Jacomet, [et al.] // *Allergy Asthma & Clinical Immunology*. – 2018. – Vol. 14. – № 1. – P. 14.
19. 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 and Clinical Immunology*. – 2016. – Vol. 12. – № 1. – P. 61.
20. Analysis of Sensitization Profiles in Central European Allergy Patients Focused on Animal Allergen Molecules / M. Vachová, P. Panzner, T. Vlas, P. Vítovcová

// International Archives of Allergy and Immunology. – 2020. – Vol. 181. – № 4. – P. 278–284.

21. Association between asthma, rhinitis, and conjunctivitis multimorbidities with molecular IgE sensitization in adults / V. A. Siroux, Boudier, R. Nadif, [et al.] // Allergy. – 2019. – Vol. 74. – № 4. – P. 824–827.

22. Bloom, B. Summary health statistics for U.S. children: National Health Interview Survey, 2012 / B. Bloom, L. I. Jones, G. Freeman // Vital & Health Statistics. – 2013. – Vol. 10. – № 258. – P. 1–81.

23. Cat IgA, representative of new carbohydrate cross-reactive allergens / J. Adédoyin, H. Grönlund, S. G. O. Johansson [et al.] // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2007. – Vol. 119. – № 3. – P. 640–645.

24. Characterization of recombinant cat albumin: Characterization of recombinant cat albumin / R. Reininger, I. Swoboda, B. Bohle [et al.] // Clinical & Experimental Allergy. – 2003. – Vol. 33. – № 12. – P. 1695–1702.

25. Characterization of sensitization to furry animal allergen components in an adult population / Sh. Suzuki, B. I. Nwaru, L. Ekerljung [et al.] // Clinical & Experimental Allergy. – 2019. – Vol. 49. – № 4. – P. 495–505.

26. Characterization of the dog lipocalin allergen Can f 6: the role in cross-reactivity with cat and horse / O. B. Nilsson, J. Binnmyr, A. Zoltowska [et al.] // Allergy. – 2012. – Vol. 67. – № 6. – P. 751–757.

27. Consensus document on dog and cat allergy / I. Dávila, J. Domínguez-Ortega, A. Navarro-Pulido [et al.] // Allergy. – 2018. – T. 73. – № 6. – Pp. 1206–1222.

28. Conversion of the major birch pollen allergen, Bet v 1, into two nonanaphylactic T cell epitope-containing fragments: candidates for a novel form of specific immunotherapy / S. Vrtala, K. Hirtenlehner, L. Vangelista [et al.] // The Journal of Clinical Investigation. – 1997. – Vol. 99. – № 7. – P. 1673–1681.

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, Osamu Ishibashi 1, Keisuke Sugiura [et al.] // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 1503.

30. Curin, M. Allergy to pets and new allergies to uncommon pets / M. Curin, C. Hilger // *Allergologie Select.* – 2017. – Vol. 1. – № 2. – P. 214–222.
31. Cysteine proteinase inhibitor Act d 4 is a functional allergen contributing to the clinical symptoms of kiwifruit allergy / M. M. Popovic, M. Milovanovic, L. Burazer [et al] // *Molecular Nutrition & Food Research.* – 2010. – Vol. 54. – № 3. – P. 373–380.
32. EAACI Molecular Allergology User's Guide / P. M. Matricardi, J. Kleine-Tebbe, H. J. Hoffmann [et al.] // *Pediatric Allergy and Immunology.* – 2016. – Vol. 27. – P. 1–250.
33. Early-life inhalant allergen exposure, filaggrin genotype, and the development of sensitization from infancy to adolescence / A. H. Simpson, A. Brough, S. Haider [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2020. – Vol. 145. – № 3. – P. 993–1001.
34. Elia, G. Protein Biotinylation / G. Elia // *Current Protocols in Protein Science.* – 2010. – Vol. 60. – № 1. – P. 361–372.
35. Elisyutina, O.G. New approaches to allergen-specific immunotherapy (ASIT): development of a recombinant vaccine against birch pollen allergy / O. G. Elisyutina, N. Shershakova, V. V. Smirnov // *Immunologiya.* – 2022. – Vol. 43. – № 6. – P. 621–631.
36. Evolution of IgE responses to multiple allergen components throughout childhood / R. Howard, D. Belgrave, P. Papastamoulis [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2018. – Vol. 142. – № 4. – P. 1322–1330.
37. Fel d 4, a cat lipocalin allergen / W. Smith, A. J. L. Butler, L. A. Hazell [et al.] // *Clin. Immunol. Allergy.* – 2004. – Vol. 34. – № 11. – P. 1732–1738.
38. Fel d 1 and Fel d 4 levels in cat fur, saliva, and urine / S. M. Kelly, J. Karsh, J. Marcelo [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2018. – Vol. 142. – № 6. – P. 1990–1992.
39. Fel d 1 peptides: effect on skin tests and cytokine synthesis in cat-allergic human subjects / F. E. R. Simons, M. Imada, Y. Li [et al.] // *International Immunology.* – 1996. – Vol. 8. – № 12. – P. 1937–1945.

40. Furry Animal Allergen Component Sensitization and Clinical Outcomes in Adult Asthma and Rhinitis / B. I. Nwaru, Sh. Suzuki, L. Ekerljung [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology. Practice.* – 2019. – Vol. 7. – № 4. – P. 1230–1238.
41. GA 2 LEN skin test study I: GA2LEN harmonization of skin prick testing: novel sensitization patterns for inhalant allergens in Europe / L. M. Heinzerling, G. J. Burbach, G. Edenharter [et al.] // *Allergy.* – 2009. – Vol. 64. – № 10. – P. 1498–1506.
42. Higher immunoglobulin E antibody levels to recombinant Fel d 1 in cat-allergic children with asthma compared with rhinoconjunctivitis / H. Grönlund, J. Adédoyin, R. Reininger [et al.] // *Clinical & Experimental Allergy.* – 2008. – Vol. 38. – № 8. – P. 1275–1281.
43. Highly sensitive ELISA-based assay for quantification of allergen-specific IgE antibody levels / A. Karsonova, K. Riabova, S. Villazala-Merino [et al.] // *Allergy.* – 2020. – № 10. – P. 2668–2670.
44. Identification of the main allergen sensitizers in an Iran asthmatic population by molecular diagnosis / F. Teifoori, M. Shams-Ghahfarokhi, I. Postigo [et al.] // *Allergy Asthma and Clinical Immunology* – 2014. – Vol. 10. – № 1. – P. 41.
45. IgA autoreactivity: a feature common to inflammatory bowel and connective tissue diseases / L. Kazemi-Shirazi, C. H. Gasche, S. Natter [et al.] // *Clinical & Experimental Immunology.* – 2002. – Vol. 128. – № 1. – P. 102–109.
46. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper / I. J. Ansotegui, G. Melioli, G. W. Canonica [et al.] // *World Allergy Organization Journal.* – 2020. – Vol. 13. – № 2. – P. 100080.
47. IgE and IgG Binding Patterns and T-cell Recognition of Fel d 1 and Non-Fel d 1 Cat Allergens / B. J. Hales, L. U. Chai, L. Hazell [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice.* – 2013. – Vol. 1. – № 6. – P. 656–665.
48. IgE Epitopes of the House Dust Mite Allergen Der p 7 Are Mainly Discontinuous and Conformational / M. Curin, H.-J. Huang, T. Garmatiuk [et al.] // *Frontiers Immunology.* – 2021. – Vol. 12. – P. 687294.
49. IgE-reactivity profiles to allergen molecules in Russian children with and without symptoms of allergy revealed by micro-array analysis / O. Elisyutina, C.

Lupinek, E. Fedenko [et al.] // *Pediatric Allergy of Immunology*. – 2021. – Vol. 32. – № 2. – P. 251–263.

50. Ilyina, N. I. Allergy is an interdisciplinary problem. Success is only achievable with a cross-disciplinary approach / N. I. Ilyina // *Effect Pharmacother: Allergol Immunol*. – 2012. – P. 25–36.

51. Immune Responses to Inhalant Mammalian Allergens / F. Hentges, C. Léonard, K. Arumugam, C. Hilger // *Frontiers Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – № 2. – P. 234.

52. Immunoproteomic identification of allergenic proteins in pecan (*Carya illinoensis*) pollen / M. B. Morales–Amparano, A. Valenzuela–Corral, G.R.C. Montfort [et al.] // *Journal of Proteomics*. – 2021. – № 248. – P. 104348.

53. Immunotherapy with Fel d 1 peptides decreases IL–4 release by peripheral blood T cells of patients allergic to cats / J. Pene, A. Desroches, L. Paradis [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 1998. – Vol. 102. – № 4. – P. 571–578.

54. Impact of Allergic Rhinitis and Asthma on COVID–19 Infection, Hospitalization, and Mortality / J. Ren, W. Pang, Y. Luo [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology. Practice*. – 2022. – Vol. 10. – № 1. – P. 124–133.

55. Impaired allergy diagnostics among parasite–infected patients caused by IgE antibodies to the carbohydrate epitope galactose– $\alpha$ 1,3–galactose / K. Arkestål, E. Sibanda, C. Thors [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2011. – Vol. 127. – № 4. – P. 1024–1028.

56. Interference in immunoassays by human IgM with specificity for the carbohydrate moiety of animal proteins / J. Adédoyin, S.G.O. Johansson, H. Grönlund, M. van Hage J. // *The Journal of Immunological Methods*. – 2006. – Vol. 310. – № 1–2. – P. 117–125.

57. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods / M. Asher, U. Keli, H. R. Anderson [et al.] // *European Respiratory Journal*. – 1995. – Vol. 8. – № 3. – P. 483–491.

58. Is there an association between indoor allergens and the severity of atopic dermatitis? / B. J. Cid, G. Perez–Mateluna, C. Iturriaga [et al.] // *International Journal of Dermatology*. – 2019. – Vol. 58. – № 4. – P. 433–439.
59. Justiz Vaillant, A.A. Immediate Hypersensitivity Reactions / A.A. Justiz Vaillant, R. Vashisht, P. M. Zito // *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing. – 2023. – Access: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30020687/>.
60. Larché, M.T. Cell Epitope–Based Allergy Vaccines / R. Valenta, R. L. Coffman. // *Vaccines against Allergies Current Topics in Microbiology and Immunology* – Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg – 2011. – P. 107–119.
61. Linhart, B. Mechanisms underlying allergy vaccination with recombinant hypoallergenic allergen derivatives / B. Linhart, R. Valenta // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30. – № 29. – P. 4328–4335.
62. Lipid vesicle size determines the Th1 or Th2 response to entrapped antigen / J. M. Brewer, L. Tetley, J. Richmond [et al.] // *Journal of Immunology* (Baltim. Md 1950). – 1998. – Vol. 161. – № 8. – P. 4000–4007.
63. MeDALL (Mechanisms of the Development of ALLergy): an integrated approach from phenotypes to systems medicine: Mechanisms of the Development of ALLergy / J. Bousquet, J. M. Antó, C. Auffray [et al.] // *Allergy*. – 2011. – Vol. 66. – № 5. – P. 596–604.
64. Microarray–Based Allergy Diagnosis: Quo Vadis? / H. J. Huang, R. Campana, K. Riabova [et al.] // *Frontiers of Immunology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 594978.
65. Milk–Specific IgE Reactivity Without Symptoms in Albumin–Sensitized Cat Allergic Patients / A. V. Karsonova, K. A. Riabova, M. R. Khaitov [et al.] // *Allergy, Asthma & Immunology Research*. – 2021. – № 13. – P. 668–670.
66. Molecular Allergen–Specific IgE Recognition Profiles and Cumulative Specific IgE Levels Associated with Phenotypes of Cat Allergy / K. Riabova, A. Karsonova, M. van Hage [et al.] // *International Journal of Molecular Science*. – 2022. – № 23. – P. 6984.
67. Molecular cloning, expression and modelling of cat allergen, cystatin (Fel d 3), a cysteine protease inhibitor: Cloning, expression and modelling of Fel d 3 / K.

Ichikawa, L. D. Vailes, A. Pomés, M. D. Chapman // *Clinical & Experimental Allergy*. – 2001. – Vol. 31. – № 8. – P. 1279–1286.

68. Molecular diagnosis in cat allergy / F.D. Popescu, C.S. Ganea,

C. Panaitescu, M. Vieru // *World Journal Methodology*. – 2021. – Vol. 11. – № 3. – P. 46–60.

69. Muraro, A. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) : Tackling the Allergy Crisis in Europe // *Veroval.info : officail website*. – 2015. – Access: [https://www.veroval.info/-/media/diagnostics/files/knowledge/eaaci\\_advocacy\\_manifesto.pdf](https://www.veroval.info/-/media/diagnostics/files/knowledge/eaaci_advocacy_manifesto.pdf).

70. Next-generation Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma (ARIA) guidelines for allergic rhinitis based on Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation (GRADE) and real-world evidence / J. Bousquet, H. J. Schünemann, A. Togias [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2020. – Vol. 145. – № 1. – P. 70–80.

71. Optimization of Allergen Standardization / K. Y. Jeong, C.-S. Hong, J.-S. Lee, J.-W. Park // *Yonsei University College of Medicine*. – 2011. – Vol. 52. – № 3. – P. 393–400.

72. Paediatric rhinitis: position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology / G. Roberts, M. Xatzipsalti, L. M. Borrego [et al.] // *Allergy*. – 2013. – № 68. – P. 1102–1116.

73. Past, present, and future of allergen immunotherapy vaccines / Y. Dorofeeva, I. Shilovskiy, K. Riabova [et al.] // *Allergy*. – 2021. – № 76. – P. 131–149.

74. Pawankar, R. WAO White Book on Allergy: Update 2013 / R. Pawankar, G. W. Canonica, S. Holgate, R. Lockey. – World Allergy Organization, 2013. – 242 p.

75. Pneumococcal Components Induce Regulatory T Cells That Attenuate the Development of Allergic Airways Disease by Deviating and Suppressing the Immune Response to Allergen / A. N. Thorburn, A. C. Brown, P. M. Nair [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2013. – Vol. 191. – № 8. – P. 4112–4120.

76. Popescu F.–D. Precision medicine allergy immunoassay methods for assessing immunoglobulin E sensitization to aeroallergen molecules / F.–D. Popescu, M. Vieru // *World J. Methodol.* – 2018. – Vol. 8. – № 3. – P. 17–36.

77. Prevalence of infant sneezing without colds and prediction of childhood allergy diseases in a prospective cohort study / K. D. Yang, C.–C. Wu, M.–T. Lee, [et al.] // *Oncotarget.* – 2018. – Vol. 9. – № 7. – P. 7700–7709.

78. Preventive Allergen–Specific Vaccination Against Allergy: Mission Possible? / I. Tulaeva, B. Kratzer, K. Riabova [et al.] // *Frontiers Immunology.* – 2020. – № 11. – P. 1368.

79. Quantitative assessment of exposure to dog (Can f 1) and cat (Fel d 1) allergens: Relation to sensitization and asthma among children living in Los Alamos, New Mexico / J. Ingram, R Sporik, G Rose [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 1995. – Vol. 96. – № 4. – P. 449–456.

80. Recombinant allergens for immunotherapy: state of the art / Y. Zhernov, M. Curin, M. Khaitov [et al.] // *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology.* – 2019. – Vol. 19. – № 4. – P. 402–414.

81. RIFM fragrance ingredient safety assessment, p–menth–8–en–2–one, CAS Registry Number 7764–50–3 / A. M. Api, D. Belsito, B.L. Botelho [et al.] // *Food and Chemical Toxicology.* – 2019. – Vol. 127. – P. S200–S207.

82. Self–reported allergies in Russia and impact on skin / S. Seité, C. Taieb, T. L. Strugar [et al.] // *SAGE Open Med.* – 2020. – Vol. 8. – P. 205031212095791.

83. 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. Asarnoj, C. Hamsten, K. Wadén [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2016. – Vol. 137. – № 3. – P. 813– 821.

84. Sensitization to Cat: When Is Nasal Challenge Needed? / M. Al–Ahmad, E. Jusufovic, N. Arifhodzic [et al.] // *International Archives of Allergy and Immunology.* – 2019. – Vol. 179. – № 2. – P. 108–113.

85. Serum albumins – Unusual allergens / M. Chruszcz, K. Mikolajczak, N. Mank [et al.] // *Biochimica and Biophysica Acta.* – 2013. – Vol. 1830. – № 12. – P. 5375–5381.

86. Skevaki, C. Advances in mechanisms of allergic disease in 2017 / C. Skevaki,

H. Renz // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2018. – Vol. 142. – № 6. – P. 1730–1739.

87. Sparkes, A. H. Human allergy to cats: A review for veterinarians on prevalence, causes, symptoms and control / A. H. Sparkes // *Journal of Feline Medicine and Surgery*. – 2022. – Vol. 24. – № 1. – P. 31–42.

88. Specific IgE and IgG measured by the MeDALL allergen–chip depend on allergen and route of exposure: The EGEA study / V. Siroux, C. Lupinek, Y. Resch [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2017. – Vol. 139. – № 2. – P. 643–654.

89. Standardization of Allergen Extracts / J. N. Larsen, S. Dreborg, red. P. Lympny, M. G. Jones // *Allergy Methods in Molecular Biology*. – New York, NY : Springer New York, 2019. – P. 63–76.

90. Tabar, A. I. Double–blind, randomized, placebo–controlled trial of allergen–specific immunotherapy with the major allergen Alt a 1 / A. I. Tabar, L. Prieto, P. Alba // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2019. – Vol. 144. – № 1. – P. 216–223.

91. The «Stay at home» COVID–19 lockdown restriction may have prevented asthma exacerbations in children affected by pollen allergy: a single center experience / L. Pecoraro, R. Castagnoli, C. Salemi [et al.] // *Minerva Pediatrica*. – 2021. – № 10. – P. 2724.

92. The allergenic activity and clinical impact of individual IgE–antibody binding molecules from indoor allergen sources / L. Caraballo, R. Valenta, K. Riabova [et al.] // *World Allergy Organization Journal*. – 2020. – № 13. – P. 100118.

93. The cat lipocalin Fel d 7 and its cross–reactivity with the dog lipocalin Canf 1 / D. Apostolovic, S. Sánchez–Vidaurre, K. Waden [et al.] // *Allergy*. – 2016. – Vol. 71. – № 10. – P. 1490–1495.

94. The Crystal Structure of the Major Cat Allergen Fel d 1, a Member of the Secretoglobulin Family / L. Kaiser, H. Grönlund, T. Sandalova, [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 39. – P. 37730–37735.

95. The Finnish Allergy Program 2008–2018: Society–wide proactive program for change of management to mitigate allergy burden / T. Haahtela, E. Valovirta, K. Saarinen [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2021. – Vol. 148. – № 2. – P. 319–326.

96. The hygiene hypothesis: current perspectives and future therapies / L. T. Stiemsma, L. A. Reynolds, S. E. Turvey, B. B. Finlay // *ImmunoTargets Theraphy*. – 2015. – P. 143.

97. The Major Cat Allergen, Fel d 1, in Diagnosis and Therapy / H. Grönlund, T. S. Wennberg, G. Gafvelin [et al.] // *International Archives of Allergy and Immunology*. – 2010. – Vol. 151. – № 4. – P. 265–274.

98. The protein S–nitrosylation of splicing and translational machinery in vascular endothelial cells is susceptible to oxidative stress induced by oxidized low– density lipoprotein / X. Xu, H. Qiu, F. Shi [et al.] // *Journal Proteomics*. – 2019. – Vol. 195. – P. 11–22.

99. The role of allergen-specific IgE, IgG and IgA in allergic disease / M. H. Shamji, R. Valenta, T. Jardezy [et al.] // *Allergy*. – 2021. – Vol. 76. – № 12. – P. 3627–3641.

100. Toward personalization of asthma treatment according to trigger factors / K. Niespodziana, K. Borochova, K. Riabova [et al.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2020. – № 145. – P. 1529–1534.

101. Tracing IgE–Producing Cells in Allergic Patients / J. Eckl–Dorna, S. Villazala–Merino, K. Riabova [et al.] // *Cells*. – 2019. – № 8. – P. 994.

102. Treatment of cat allergy with T–cell reactive peptides / P.S. Norman, J. L. Ohman Jr, A.A. Long [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 1996. – Vol. 154. – № 6. – P. 1623–1628.

103. Two galactose– $\alpha$ –1,3–galactose carrying peptidases from pork kidney mediate anaphylactogenic responses in delayed meat allergy / C. Hilger, J. Fischer, K. Swiontek [et al.] // *Allergy*. – 2016. – Vol. 71. – № 5. – P. 711–719.

104. Two Newly Identified Cat Allergens: The von Ebner Gland Protein Fel d 7 and the Latherin–Like Protein Fel d 8 / W. Smith, S. E. O'Neil, B. J. Hales [et al.] // *International Archives of Allergy and Immunology*. – 2011. – Vol. 156. – № 2. – P. 159170.

105. Usefulness of component resolved analysis of cat allergy in routine clinical practice / K. Eder, S. Becker, M. S. Nicoló [et al.] // *Allergy Asthma and Clinical Immunology*. – 2016. – Vol. 12. – № 1. – P. 58.

106. 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. – P. 1–7.

107. Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease / V. Niederberger, F. Horak, S. Vrtala [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101. – № 2. – P. 14677–14682.

108. Wollenberg, A. ETFAD/EADV Eczema task force 2015 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis in adult and paediatric patients / A. Wollenberg, S. Christen-Zäch, A. Taieb // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2016. – Vol. 30. – № 5. – P. 729–747.

109. Worsening of Asthma in Children Allergic to Cats, after Indirect Exposure to Cat at School / C. Almqvist, M. Wickman, L. Perfetti [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2001. – Vol. 163. – № 3. – P. 694–698.

110. Zahradnik, E. Animal Allergens and Their Presence in the Environment / E. Zahradnik, M. Raulf // *Frontiers Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 76.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### АНКЕТА–ОПРОСНИК

1. ФИО.
2. Дата рождения \_\_\_\_\_
3. Пол:     М   Ж
4. В течение, какого времени вы отмечаете реакцию на контакт с кошкой:
  - менее года;
  - 1–3 года;
  - 3–5 лет;
  - 5–10 лет;
  - более 10 лет.
5. Какие симптомы вы испытываете при контакте с кошкой:
  - слезотечение;
  - зуд век (дискомфорт в области глаз);
  - заложенность носа;
  - ринорея;
  - зуд кожи;
  - высыпания;
  - приступы затрудненного дыхания.
6. Вы наблюдаетесь аллергологом?                   Да/Нет
7. Проходили ли вы обследование в рамках диагностики аллергии? Объем обследования:
  - уровень общего  $i\text{gE}$ ;
  - скарификационное тестирование / прик–тестирование                   с нативными аллергенами;
  - оценка уровня специфических  $i\text{gE}$ ;
  - молекулярная алергодиагностика.
8. Были ли выявлена сенсibilизация? Если да, укажите свои аллергены.
  - пыльца деревьев;

- пыльца злаковых трав;
- пыльца сорных трав;
- клещи домашней пыли;
- библиотечная пыль;
- шерсть кошки;
- шерсть собаки;
- перхоть лошади;
- непатогенные плесневые грибы (плесень);
- другое.

9. Был установлен один (несколько) из следующих диагнозов:

- атопический дерматит;
- аллергический ринит;
- аллергический конъюнктивит;
- бронхиальная астма.

10. Какую терапию вы получаете?

11. Оцените эффективность своей терапии по шкале от 1 (нет эффекта)

до 10 (полный регресс симптомов):

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

12. Проходили ли вы когда-либо курс АСИТ? Если да, укажите аллергены продолжительность курса (1–3 года).

13. Оцените эффективность терапии АСИТ по шкале от 1 (нет эффекта) до 10 (полный регресс симптомов):

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

14. Имеете ли хронические заболевания, помимо указанных выше?

Если да, укажите какие.

Также каждому пациенту было предложено ознакомиться с информацией об исследовании следующего содержания:

## **ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПАЦИЕНТА И ИНФОРМИРОВАННОЕ СОГЛАСИЕ**

для участия в научном исследовании.

Проект: «Cat Project».

Врачи–исследователи – академик Караулов Александр Викторович, д–р мед. наук, профессор, заведующий лаборатории иммунопатологии, НИИ молекулярной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Карсонова Антонина Васильевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории иммунопатологии, НИИ молекулярной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Рябова Ксения Александровна, аллерголог–иммунолог, мл. науч. сотр. лаборатории иммунопатологии, НИИ молекулярной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Цель работы: создание молекулярных аллергенов кошки и исследование IgE–реактивности к ним сывороток пациентов с клиническими симптомами аллергии на кошку для последующей разработки вакцины нового поколения от аллергии на кошку.

В данном проекте будут принимать участие совершеннолетние пациенты с клиническими симптомами сенсibilизации к кошкам.

Уважаемый пациент, Вам предлагается участие в данном исследовании. О порядке его проведения Вам подробно расскажет врач–исследователь. Информация об исследовании представлена также в настоящей форме согласия. После того как Вы ознакомитесь с информацией, у Вас будет возможность задать врачу–исследователю или другому сотруднику исследовательского центра возникшие вопросы и получить дополнительные разъяснения. Если Вы примете решение участвовать в предложенном исследовании, то после того как Вы получите ответы на все интересующие вопросы, Вам будет предложено письменно подтвердить свое согласие, поставив подпись на последней странице данной формы. Никакие процедуры исследования не могут быть проведены до тех пор, пока Вы не подпишете форму информированного согласия. Ваше участие в данной

научно–исследовательской работе является добровольным. В любое время Вы можете принять решение о прекращении участия в исследовании. Ваше решение прекратить участие в исследовании не повлияет на порядок предоставления Вам медицинской помощи и отношение к Вам сотрудников исследовательского центра.

Информация об исследовании.

Аллергия на шерсть животных (кошек, собак или обоих видов животных) наблюдается у все большего количества людей и считается основным фактором риска развития астмы и ринита. Важным этапом в диагностике аллергии на шерсть животных стали методы на основе молекулярных компонентов аллергенов. В данном исследовании будет проведена оценка профиля IgE–сенсibilизации к панели молекулярных аллергенов Fel d 1–8 у пациентов с клиническими симптомами аллергии на кошку, полученные данные о профиле сенсibilизации, а также функциональной активности молекулярных аллергенов Fel d 1–8, в дальнейшем будут использованы при создании вакцины нового поколения от аллергии на кошку.

Возможные риски, побочные реакции. Возможные риски в ходе исследования минимальны и могут быть обусловлены процедурой забора крови. Забор крови может производиться натошак. Перед проведением процедуры необходимо предупредить врача–исследователя о ранее перенесённых осложнениях при проведении венепункции или о наличии гематологических заболеваний. Взятие образцов крови может сопровождаться небольшими болевыми ощущениями или осложниться образованием паравазальной гематомы (синяк), крайне редко – обмороком.

Конфиденциальность. Для защиты личной информации и обеспечения конфиденциальности записей будут предприниматься все необходимые меры, однако полная конфиденциальность гарантирована не будет, так как результаты исследования могут быть опубликованы в медицинской литературе или журналах и представлены на научных конференциях, а также использованы в образовательных целях. ФИО и полная дата рождения будут скрыты во избежание идентификации личности пациента третьими лицами. Никакая личная информация

в материалах, предназначенных для обучения или презентации широкому кругу лиц, раскрыта не будет.

В рамках исследования экспериментальные лечебные методики применяться не будут. Ваше участие в этом исследовании и использование Ваших данных является добровольным.