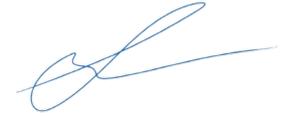


На правах рукописи



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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2024

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Караулов Александр Викторович

Официальные оппоненты:

Ненашева Наталья Михайловна - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра аллергологии и иммунологии, заведующий кафедрой

Латышева Елена Александровна - доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, отделение иммунопатологии клиники, руководитель отделения

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

Защита диссертации состоится «18» февраля 2025 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.34 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>
Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Калужин Олег Витальевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 гиперсенситилизованного 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 сенситилизацию 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 R¹, Belgrave D², Papastamoulis P¹, Simpson A³, Rattray M¹, Custovic A⁴.

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.

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 Уральского отделения Российской академии наук (г. Екатеринбург). Исследование проводилось с участием 228 детей с установленным диагнозом «аллергический ринит»,

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

² Section of Paediatrics, Department of Medicine, Imperial College London, London, United Kingdom.

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

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

использовались клиничко- 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 сенсибилизации 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 об 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:

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.

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

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.

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

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 в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (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 – ЕСИ-2021 (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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы экспериментального и клинического исследования

В исследовании приняли участие 84 пациента в возрасте от 18 до 52 лет с подтвержденными симптомами аллергии на кошку. Для оценки профиля сенсibilизации была выбрана когорта пациентов, проживающих на территории Москвы, Московской области и Екатеринбурга, сыворотки которых находились в банке сывороток лаборатории Иммунопатологии Института Молекулярной Медицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Этапы исследования были следующие:

1. Экспрессия и очистка аллергенов;
2. Оценка функциональной активности полученных аллергенов;
3. Биотилинизация аллергенов;
4. Количественное определение уровней аллерген-специфического IgE;
5. Статистическая обработка результатов.

В данном 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 биотилинизации,
- SPSS 11.5 for Windows.

Характеристика пациентов с аллергией на кошек

В качестве первого шага все пациенты заполнили стандартизированный опросник ISAAC для получения доказательств первой линии в пользу или против аллергического фенотипа. Субъекты, которые были положительными в соответствии с опросником ISAAC, были дополнительно исследованы на наличие аллергической сенсibilизации с использованием стандартных методов диагностики аллергии, включая анамнез, кожный прик-тест и определение общего и специфического IgE в соответствии с традиционным диагностическим путем. На

момент тестирования пациенты не получали никакой терапии. Кожные прик-тесты для подтверждения сенсibilизации к кошкам можно было провести у 66 пациентов с аллергическими симптомами при воздействии на кошку с использованием экстрактов кошачьих аллергенов от Microgen (Москва, Россия) или Stallergenes (Antony, Франция). Аллергические симптомы были классифицированы соответствии с критериями ATS/ERS с рекомендациями GINA и Европейскими рекомендациями по классификации ринита.

Экспрессия и очистка аллергенов

природные Fel d 2 и Fel d 6 были приобретены у Sigma (Вена, Австрия), а антитела и анализы были приобретены у Rockland (Пайквилл, Мэриленд, США). Синтетические гены, кодон-оптимизированные для экспрессии *E. coli*, кодирующие Fel d 3, Fel d 4, Fel d 7 и Fel d 8 с 30 ДНК, кодирующей С-концевой гексагистидиновый хвост, были синтезированы и вставлены в NdeI/EcoRI сайты плазмиды pET27b (ATG, Мерцхаузен, Германия). Последовательности ДНК и их правильное встраивание в плазмиду подтверждали автоматическим секвенированием обеих цепей ДНК (ATG). *E. coli* BL21 DE3, трансформированные плазмидами, экспрессирующими Fel d 3, Fel d 4, Fel d 7 и Fel d 8, выращивали при 37 °С в инкубаторе в среде LB, содержащей канамицин (34 мкг/мл) при 37°С пока они не достигли плотности клеток (ОП600 нм) 0,3–0,6. Экспрессию белков rFel d 3 или rFel d 7 индуцировали добавлением 1 мМ изопропил-β-тиогалактопиранозид в течение 3 ч при 37°С. Клетки собирали центрифугированием при 10 000 g в течение 10 мин и замораживали. Осадок из 400-мл культуры вскрывали тремя циклами замораживания-оттаивания, ресуспендировали в 40 мл 20 мМ трис-HCl (pH 7) и 10 мМ имидазола, затем инкубировали в течение ночи при 4°С при перемешивании. После центрифугирования осадок отбрасывали, а супернатанты подвергали аффинной очистке никеля в нативных условиях, как описано в протоколе очистки Qiagen (Quiagen, Hilden, Germany). Экспрессию белков rFel d 4 или rFel d 8 индуцировали добавлением 1 мМ изопропил-β-тиогалактопиранозид в течение 3 ч при 37°С. Клетки собирали центрифугированием при 10 000 g в течение 10 мин и замораживали. Осадок из 400 мл культуры ресуспендировали в 40 мл 8 М мочевины, 10 мМ трис-HCl (pH 8) и 100 мМ NaH₂PO₄; далее гомогенизировали с помощью Ultra-Turrax (Ika, Stauffen, Germany) на льду; и затем инкубировали в течение ночи при 4°С при постоянном перемешивании. Супернатант подвергали аффинной хроматографии с никелем в денатурирующих условиях (Qiagen). Фракции, содержащие чистый белок, объединяли и рефолдировали путем экстенсивного ступенчатого диализа против 2 мМ HEPES (pH 8) в случае Fel d 4 и против 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 20 мМ Трис-HCl (pH 8,5) в случае Фел д 8; их хранили в PBS в виде растворимых белков при -20 °С до использования. Чистоту

рекомбинантных белков и природных аллергенов анализировали с помощью SDS-PAGE. Молекулярная масса аллергенов была определена с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией с использованием матрицы, как описано ранее, и было обнаружено, что она соответствует молекулярной массе, предсказанной в соответствии с их последовательностями.

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 ImmunoCAP, содержащих rFel d 1, nFel d 2, rFel d 3, rFel d 4, nFel d 6, rFel d 7 и rFel d 8. Экстракт аллергена кошки Уровни -специфического IgE определяли с использованием коммерческого ImmunoCAP e1 (Thermo Fisher Scientific/Phadia). Уровни аллерген-специфического IgE, превышающие или равные 0,1 кЕА/л, считались положительными.

Характеристика пациентов с аллергией на кошек

Из 85 пациентов с клиническими симптомами аллергии на кошек один пациент с отрицательным результатом кожного теста на экстракт кошачьей перхоти был исключен из группы исследования. 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. В исследование были включены 84 пациента, 57 мужчин и 27 женщин, с такими клиническими симптомами аллергии на кошку, как астма, ринит, конъюнктивит и дерматит, а также пациенты с подтвержденной сенсibilизацией к кошкам в анамнезе (таблица 2). Среди них 67 пациентов страдали астмой, 81 пациент страдал ринитом, 70 пациентов – конъюнктивитом и 20 пациентов имели симптомы дерматита. Средний возраст пациентов составил 27,19 лет.

Мы обнаружили, что у 62 из 70 пациентов и 11 из 14 пациентов уровни IgE, специфичные для перхоти кошек, выше или равны 0,1 кЕА/л, соответственно. Кумулятивные уровни IgE, превышающие или равные 0,1 кЕА/л для молекул кошачьих аллергенов, были обнаружены у 75 из 84 пациентов с аллергическими симптомами, связанными с кошками. Пять пациентов с положительным кожным тестом имели отрицательный результат на уровни IgE, характерные для суммы молекул аллергена.

Таблица 1 – 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
Пациенты с уровнем специфических IgE антител > 0,1 кЕд А /л (N = 73)						
50	23	26,71 (18-52)	59	70	61	19

Роль rFel d 1 как основного аллергена кошек и место других аллергенов в структуре сенсibilизации пациентов

В таблице 2 показаны уровни IgE, характерные для экстракта кошачьего аллергена и молекул кошачьего аллергена, для всех 84 пациентов с аллергическими симптомами, связанными с кошками. Представлены данные 73 пациентов, чьи средние уровни IgE, специфичные для экстракта перхоти кошки и каждой из семи протестированных молекул аллергена, были равным или превышали 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 2). Согласно установленному пороговому уровню, 2 из 73 пациентов были идентифицированы как отрицательные к rFel d 1, но у них была обнаружена IgE-реактивность к другим молекулам кошачьего аллергена. 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 кUA/л (таблица 2).

Таблица 2 – Серологическая характеристика сенсibilизации пациентов

А							
Экстракт кошачьих аллергенов кUA/L сред.	rFel d 1	nFel d 2	rFel d 3	rFel d 4	nFel d 6	rFel d 7	rFel d 8
	кUA/L сред.						

Продолжение таблицы 2

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							
Экстракт кошачьих аллергенов <i>N</i> %	rFel d 1 <i>N</i> %	nFel d 2 <i>N</i> %	rFel d 3 <i>N</i> %	rFel d 4 <i>N</i> %	nFel d 6 <i>N</i> %	rFel d 7 <i>N</i> %	rFel d 8 <i>N</i> %
<i>N</i> = 73 100%	<i>N</i> = 71 97.2%	<i>N</i> = 22 30.1%	<i>N</i> = 36 50.6%	<i>N</i> = 38 52%	<i>N</i> = 24 32.8%	<i>N</i> = 40 54.7%	<i>N</i> = 32 42.4%

Три молекулы аллергена распознавались более чем у 50% пациентов в исследуемой группе (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.

Корреляция кумулятивной суммы уровней IgE, специфичных для молекул аллергена, и IgE, специфичными для экстракта

Совокупные уровни аллерген-специфических IgE (сумма уровней IgE, специфичных 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 1). 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. 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, пациентов с молекулами аллергена было выявлено на два больше, чем пациентов с экстрактом кошачьего аллергена. Однако у 9 из 84 пациентов с аллергическими симптомами, связанными с кошками, не было обнаружено специфических кошачьих аллергенов IgE (Таблица 2). 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 при контакте с кошкой .

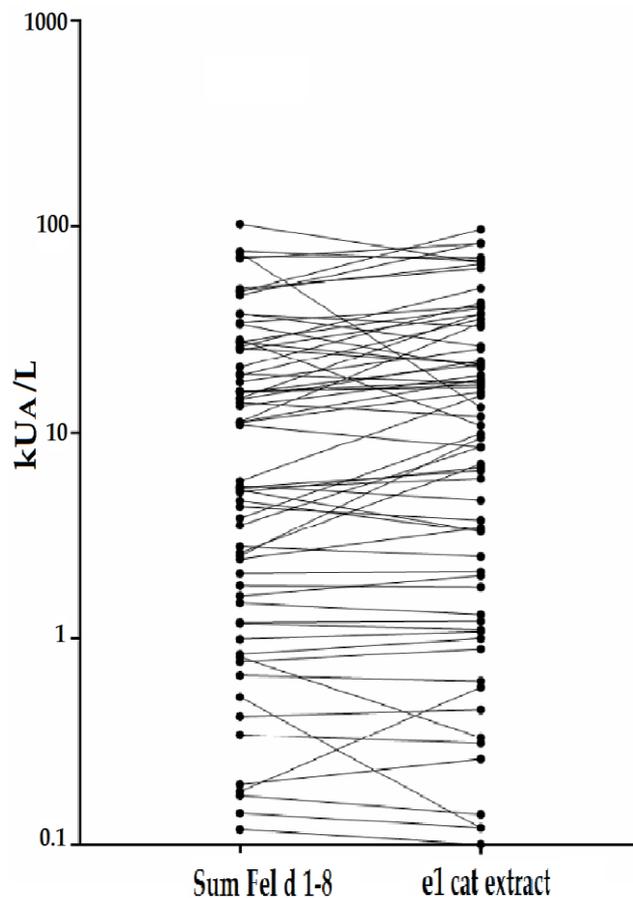


Рисунок 1 – Корреляция между уровнями спец.IgE к экстракту аллергена кошки и сумме Fel d1- 8

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

На рисунках 2 и 3 показана распространенность распознавания IgE и уровни IgE, специфичного 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 частотам сенсibilизации 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.

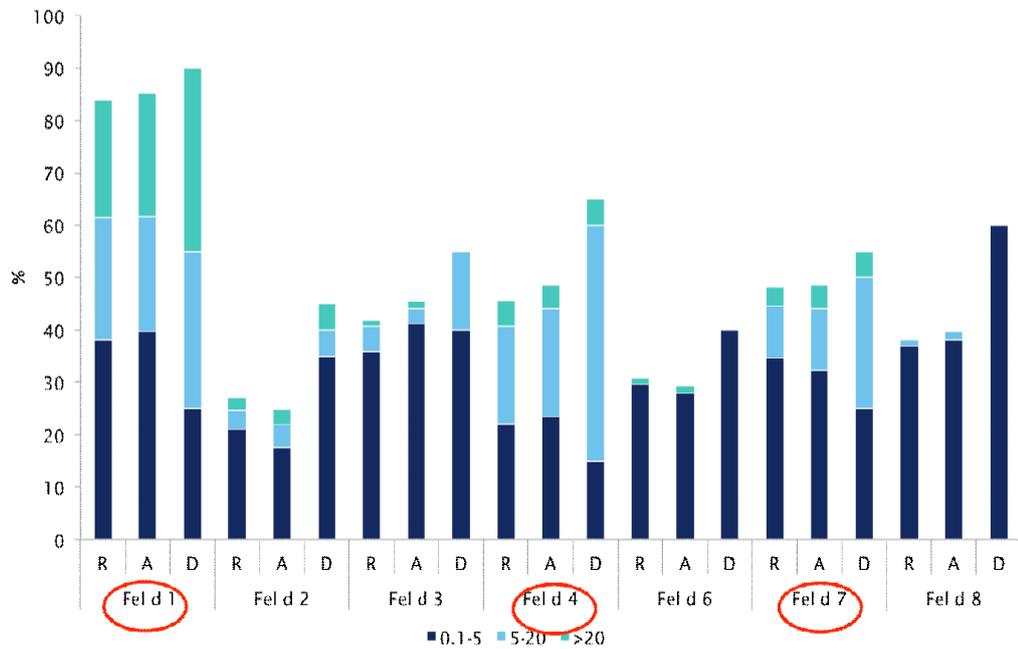


Рисунок 2 – Уровни asIgE к 8 аллергенам кошек у пациентов с различными симптомами аллергии (ринит R, бронхиальная астма A, кожные проявления D)

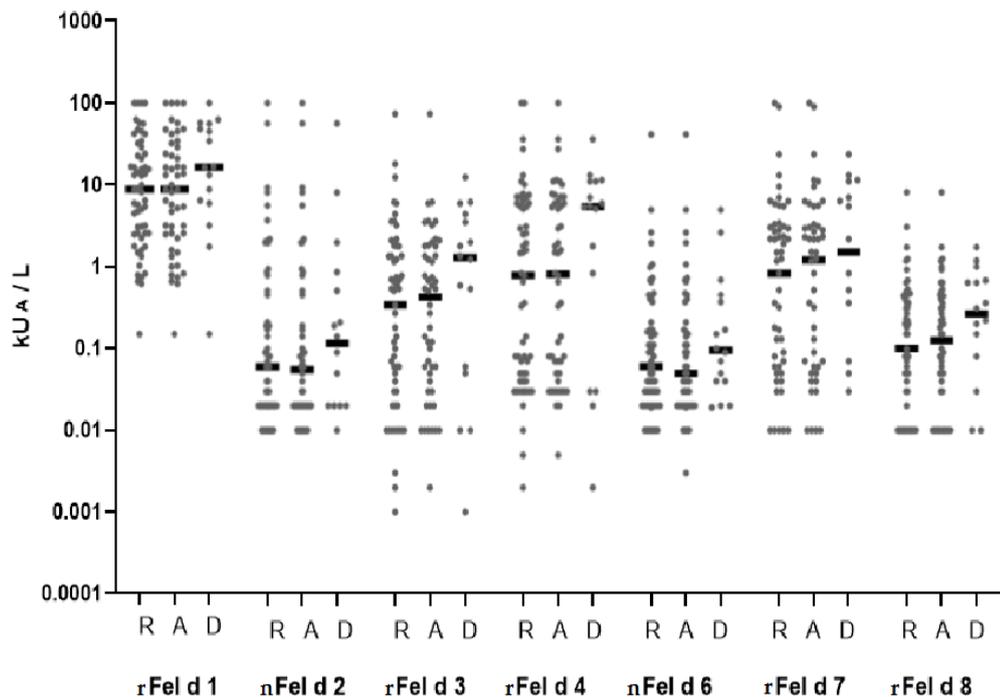


Рисунок 3 – Уровни IgE (ось ординат: сенсibilизация, измеренная в kUA/L; средние уровни IgE указаны горизонтальными полосами), специфичные для молекул аллергенов кошек (Fel d 1–Fel d 8) у пациентов с различными симптомами аллергии на кошек (R: ринит ; A: астма; D: дерматит)

У 21 пациента были выражены 1-2 симптома 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, среднее количество распознанных аллергенов у пациентов с 3 симптомами – 3,82, а среднее количество распознанных аллергенов у пациентов с 4 симптомами – 4,38 (рисунок 4 и 5).

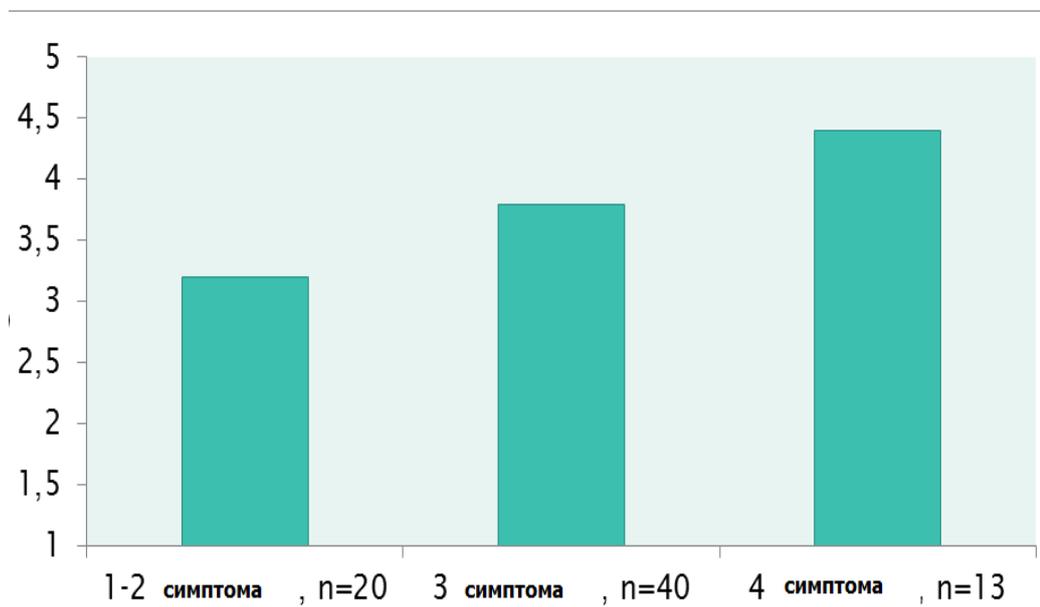


Рисунок 4 – Оценка уровня sIgE у пациентов имеющих разное количество клинических симптомов

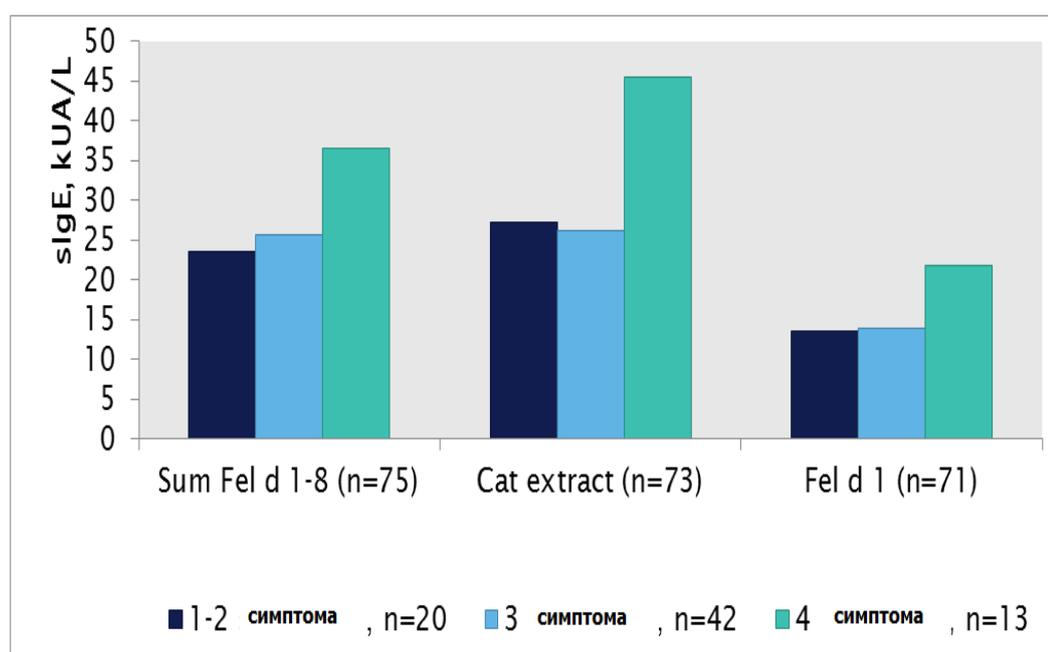


Рисунок 5 – Уровни sIgE к сумме Fel d 1-8, экстракту аллергена кошки и Fel d 1 у пациентов с разным количеством симптомов

При сравнении суммы уровней IgE, специфичных к молекулам аллергена, уровней IgE, специфичных к экстракту аллергена кошки, и уровней IgE, специфичных к rFel d 1, оказалось, что уровни аллерген-специфических IgE были значительно выше у пациентов с четырьмя симптомами, по сравнению с пациентами с 1–2 симптомами (рисунок 5). Интересно, что это различие было более выраженным для суммы уровней IgE, специфичных для молекул аллергена и кошачьего экстракта, чем для уровней IgE, специфичных только для rFel d 1.

ВЫВОДЫ

1. Исследование показало, что аллергены Fel 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. Использование панели молекулярных аллергенов демонстрируют более высокую специфичность в диагностике аллергии на кошку.

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Tracing IgE-Producing Cells in Allergic Patients. / J. Eckl-Dorna, S. Villazala-Merino, **K. Riabova** [et al.] // **Cells**. – 2019. – № 8. – P. 994. – DOI: 10.3390/cells8090994. [Scopus]
2. 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 Organ J**. – 2020. – № 13. – P. 100118. – DOI: 10.1016/j.waojou.2020.100118. [Scopus]
3. Toward personalization of asthma treatment according to trigger factors / K. Niespodziana, K. Borochova, **K. Riabova** [et al.] // **Allergy Clin Immunol**. – 2020. – № 145. – P. 1529-1534. – DOI: 10.1016/j.jaci.2020.02.001. [Scopus]
4. 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. – DOI: 10.1111/all.14325.
5. Preventive Allergen-Specific Vaccination Against Allergy: Mission Possible? / I. Tulaeva, B. Kratzer, **K. Riabova** [et al.] // **Front Immunol**. – 2020. – № 11. – P. 1368. – DOI: 10.3389/fimmu.2020.01368. [Scopus]
6. Past, present, and future of allergen immunotherapy vaccines / Y. Dorofeeva, I. Shilovskiy, **K. Riabova** [et al.] // **Allergy**. – 2021. – № 76. – P. 131-149. – DOI: 10.1111/all.14300. [Scopus]
7. 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 Immunol Res**. – 2021. – № 13. – P. 668-670. – DOI: 10.4168/aair.2021.13.4.668. [Scopus]
8. Microarray-Based Allergy Diagnosis: Quo Vadis? / H.J. Huang, R. Campana, **K. Riabova** [et al.] // **Front Immunol**. – 2021. – № 11. – P. 594978. – DOI: 10.3389/fimmu.2020.594978. [Scopus]
9. Molecular Allergen-Specific IgE Recognition Profiles and Cumulative Specific IgE Levels Associated with Phenotypes of Cat Allergy / **K.A. Riabova**, A.V. Karsonova, M. van Hage [et al.] // **Int J Mol Sci**. – 2022. – № 23. – P. 6984. – DOI: 10.3390/ijms23136984. [Scopus]

10. Albumins represent highly cross-reactive animal allergens / Z. Liu, D. Trifonova, **К. Riabova** [et al.] // **Front Immunol.** – 2023. – № 14. – P. 1241518. – DOI: 10.3389/fimmu.2023.1241518.[Scopus]

11. Allergenic Activity of Individual Cat Allergen Molecules / D. Trifonova, C. Mirela, **К. Riabova** [et al.] // **International Journal of Molecular Sciences** 24. – 2023. – № 23. – P. 16729. – URL: <https://doi.org/10.3390/ijms242316729>. [Scopus]

12. 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. – DOI: 10.47056/0365-9615-2023-175-6-664-669.

13. Характеристика аллергенов кошки / **К.А. Рябова**, Е.М. Козлов, Д. Трифонова, [и др.] // Иммунология. – 2023. – Т. 44. – № 3. – С. 368–378.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСИТ – аллерген-специфическая иммунотерапия

GA2LEN – Global Allergy and Asthma European Network – консорциум ведущих научных центров, занимающихся проблемами аллергий и астмы.

ImmunoCAP ISAC – Immuno-Solid phase Allergen Chip – аллергочипы на твердой фазе, это первый мультиплексный тест для *in vitro* диагностики аллергии, основанный исключительно на аллергокомпонентах (молекулярная алергодиагностика).

BAMSE – Barn/Children Allergy Milieu Stockholm Epidemiology – шведский исследовательский проект, изучающий развитие астмы и аллергии у детей.

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay – иммуноферментный анализ.