

Молекулярный профиль сенсibilизации к аллергенам собаки: диагностика с использованием «АллергочипРФ»

Е.М. Козлов^{1,2}, Д.Р. Трифонова^{1,2,3}, К.А. Рябова¹, А.А. Дубовец^{1,2}, А.М. Винцевская¹,
А.Д. Лукашевичус¹, А.А. Баскаков¹, Д.С. Фомина^{1,4}, И.В. Евсегнеева¹, А.В. Караулов^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва

² Лаборатория иммунологии и инфектологии, научный центр LIFT (Life Improvement by Future Technologies), Москва

³ Медицинский университет Вены, Австрия

⁴ ГБУЗ «Городская клиническая больница №52» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва

Molecular profile of sensitization to dog allergens: diagnostics using the “AllergochipRF” platform

E.M. Kozlov^{1,2}, D.R. Trifonova^{1,2,3}, K.A. Ryabova¹, A.A. Dubovets^{1,2}, A.M. Vintsevskaya¹,
A.D. Lukashevichus¹, A.A. Baskakov¹, D.S. Fomina^{1,4}, I.V. Evsegneeveva¹, A.V. Karaulov^{1,2}

¹ Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² Laboratory of Immunology and Infectology, LIFT Science Center (Life Improvement by Future Technologies), Skolkovo Innovation Center, Moscow, Russia

³ Medical University of Vienna, Vienna, Austria

⁴ City Clinical Hospital №52, Moscow, Russia

Аннотация

Целью настоящего исследования является оценка сенсibilизации к молекулярным аллергенам собаки Can f 1 – Can f 6 у пациентов с клиническими проявлениями бронхиальной астмы, аллергического ринита, конъюнктивита и/или атопического дерматита с использованием диагностической платформы «АллергочипРФ». Рекомбинантные аллергены Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 были экспрессированы в гетерологичной системе на основе *Escherichia coli* и очищены методом металл-хелатной аффинной хроматографии. Вторичная структура полученных белков была охарактеризована с использованием спектроскопии кругового дихроизма. В исследование было включено 100 пациентов с симптомами аллергии, из которых у 64% выявлена сенсibilизация хотя бы к одному из компонентов Can f 1 – Can f 6. Было показано, что мажорными аллергенами при аллергии на собаку являются молекулярные аллергены Can f 1, Can f 5 и Can f 6. Полученные результаты подтверждают клиническую значимость молекулярной диагностики сенсibilизации к аллергенам собаки и подчеркивают ведущую роль указанных компонентов в формировании аллергического ответа.

Ключевые слова

Молекулярная алергодиагностика, специфический IgE, аллергия на собак, микрочип.

Summary

The aim of this study was to assess sensitization to molecular dog allergens Can f 1 – Can f 6 in patients with clinical manifestations of bronchial asthma, allergic rhinitis, conjunctivitis, and/or atopic dermatitis using the diagnostic platform “AllergochipRF.” Recombinant allergens Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5, and Can f 6 were expressed in a heterologous *Escherichia coli*-based system and purified by metal-chelate affinity chromatography. The secondary structure of the obtained proteins was characterized using circular dichroism spectroscopy. The study included 100 patients with allergy symptoms, of whom 64% were found to be sensitized to at least one of the Can f 1 – Can f 6 components. The results showed that the major allergens in dog allergy are the molecular allergens Can f 1, Can f 5, and Can f 6. These findings confirm the clinical relevance of molecular diagnostics for dog allergen sensitization and highlight the key role of these components in allergic response development.

Keywords

Molecular allergy diagnostics, specific IgE, dog allergy, microarray.

Введение

Аллергия к эпителию и перхоти собаки — одна из распространенных причин IgE-опосредованной сенсибилизации и обострений бронхиальной астмы, аллергического ринита, конъюнктивита и атопического дерматита. По данным эпидемиологических исследований, доля сенсибилизированных к *Canis familiaris* пациентов достигает 10–20% в популяции пациентов с атопическими заболеваниями, а в крупных городах этот показатель может быть ещё выше [1]. Высокая распространенность домашних животных, длительное персистирование аллергенов в жилых помещениях и перекрёстная реактивность с белками других видов животных усложняют клиническую картину и требуют точной диагностики.

Клинически значимые аллергены собак представлены несколькими молекулярными семействами: липокалинами (Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 6), сывороточным альбумином (Can f 3) и простатическим калликреином (Can f 5) [2]. Профили сенсибилизации к этим компонентам отличаются выраженной гетерогенностью и определяют разнообразие клинических фенотипов. Традиционные методы *in vitro* диагностики, основанные на использовании экстрактов аллергенов, не позволяют дифференцировать сенсибилизацию к отдельным белкам и предсказать перекрёстные реакции. Молекулярная алергодиагностика решает эту задачу, определяя IgE к индивидуальным компонентам и тем самым повышая точность диагностики и прогноза заболевания.

Современные микрочип-платформы, такие как отечественный «АллергочипРФ», дают возможность одновременно исследовать IgE-реактивность к расширенной панели молекулярных аллергенов при минимальном объеме сыворотки. Однако достоверность таких анализов напрямую зависит от качества рекомбинантных белков и их корректного фолдинга.

В настоящем исследовании были получены рекомбинантные аллергены Can f 1 – Can f 6 с корректной вторичной структурой, а также проведена оценка частоты сенсибилизации к этим компонентам в когорте из 100 пациентов с аллергическими заболеваниями, включая бронхиальную астму, аллергический ринит, конъюнктивит и атопический дерматит. Результаты работы позволяют уточнить молекулярный профиль сенсибилизации к аллергенам собаки и подтверждают клиническую значимость диагностики на основе микрочипов.

Методы исследования

Получение молекулярных аллергенов Can f 1 – Can f 6

Плазмидные конструкции, кодирующие рекомбинантные формы аллергенов *Can f 1*, *Can f 2*, *Can f 4*, *Can f 5* и *Can f 6*, были предоставлены Центром патофизиологии, инфектологии и иммунологии Венского медицинского университета (Институт патофизиологии и исследований в области аллергии). Все нуклеотидные последовательности были оптимизированы, редкие кодоны заменены на кодоны с большей частотой встречаемости. Конструирование плазмид осуществлялось компанией ATG:biosynthetics GmbH (Германия). В качестве экспрессионных векторов использовались плазмиды pET27b, pET22b и pET17b. Для обеспечения возможности последующей очистки белков методом металл-хелатной аффинной хроматографии ко всем конструкциям была добавлена С-концевая гексагистиридиновая метка (His₆).

Гены *Can f 4* (GenBank: GU132996.1) и *Can f 6* (HE653774.1) были синтетически синтезированы и клонированы в вектор pET27b с использованием сайтов рестрикции NdeI/XhoI. Ген *Can f 1* был клонирован в вектор pET17b по аналогичным сайтам рестрикции (NdeI/XhoI). Синтетическая конструкция гена *Can f 2* (GenBank: AF027178.1) была вставлена в вектор pET22b по сайтам NdeI/EcoRI.

Конструкция, содержащая последовательность дикого типа гена *Can f 5* (GenBank: Y00751.1), была получена путем клонирования в вектор pET27b, устойчивый к канамицину, с использованием сайтов NdeI/EcoRI. Для получения экспрессионной формы *Can f 5* без N-концевого сигнального пептида и с С-концевой His₆-меткой проводили ПЦР с использованием следующих олигонуклеотидных праймеров: прямой: 5'-ТАТСАТАТGGAACCGCATTTCCAACCGC-3', обратный: 5'-ТАСТCGAGCGTGTTTGCTTTCATCGTGTC-3'. Полученный амплифицированный фрагмент был клонирован в вектор pET22b, резистентный к ампициллину, с использованием сайтов рестрикции NdeI/XhoI. Вставки целевых генов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5, Can f 6 с искомыми нуклеотидными последовательностями были подтверждены методом автоматического секвенирования по Сэнгеру.

Для наработки плазмидной ДНК векторные конструкции с целевыми генами Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 были трансформированы в бактериальный штамм *E.coli* XL-1 Blue. Для трансформации 1 мкл ДНК добавлялся к 50 мкл компетентных клеток XL-1 Blue в течение

30 минут на льду. Далее выполнялся тепловой шок путем инкубации клеточной суспензии при температуре 42°C. После чего клеточную суспензию инкубировали на льду в течение 2–3 минут и вносили 500 мкл супербогатой питательными веществами микробиологической среды (SOC). Клеточные суспензии инкубировали в течение часа в терморегулируемом шейкере инкубаторе при температуре 42°C и постоянном перемешивании 250 оборотов в минуту. Полученные клеточные суспензии высевали на агаризованные чашки Петри с селективирующим антибиотиком канамицином или ампицилином в концентрации 50 мг/л и инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующее утро полученные колонии инокулировали в 2 мл питательной среды Terrific в течение ночи при 37°C и постоянном перемешивании 250 оборотов в минуту. Из клеточных осадков выделяли плазмидную ДНК, определяли концентрацию и секвенировали методом автоматического секвенирования по Сэнгеру для подтверждения правильности полученных синтетических последовательностей генов *Can f 1*, *Can f 2*, *Can f 4* и *Can f 5* и *Can f 6*.

Для гетерологичной экспрессии аллергенов *Can f 1*, *Can f 2*, *Can f 4*, *Can f 5* и *Can f 6* использовали штаммы *E. coli* BL21-Gold (DE3), Rosetta-gami B (DE3) и Shuffle T7. Трансформацию проводили согласно стандартному протоколу теплового шока с использованием 50 нг плазмидной ДНК. После трансформации клетки высевали на LB-агар с ампициллином или канамицином (50 мг/л) и инкубировали при 37°C в течение 16 ч. Единичные колонии инокулировали в 450 мл среды Super Broth (SB) с соответствующим антибиотиком и культивировали при 37°C, 250 об/мин. При достижении $A_{600} = 0,8-1,0$ экспрессию индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Индукция проводилась при 18°C в течение 16 ч. После индукции клетки осаждали при 13 000 об/мин, 15 мин, 4 °C, и замораживали при -20°C.

Осадки ресуспендировали в буфере (50 мМ NaH_2PO_4 , 300 мМ NaCl , 10 мМ имидазол, pH 8,0) с добавлением лизоцима (1 мг/мл) и ДНКазы I (5 мкг/мл). Клеточный лизис проводили ультразвуком (10 с импульсы, 200–300 Вт, 3 мин). Лизаты центрифугировали при 10 000 об/мин, 30 мин, 4°C. Супернатанты инкубировали с Ni-NTA-смолой (QIAGEN, 1 мл/пробу, 1 ч, 4°C). Смолу загружали на одноразовые колонки, промывали дважды буфером (50 мМ NaH_2PO_4 , 300 мМ NaCl , 20 мМ имидазол, pH 8,0), затем элюировали белки буфером с 250 мМ имидазола. Собирали 5 фракций по 1 мл,

анализировали методом ПААГ электрофореза. Элюаты с подтвержденным содержанием целевого белка объединяли и диализировали.

Аллергокомпонент *Can f 3* получали из сывороток собак с помощью метода эксклюзионной хроматографии с использованием колонки 16/60 Superdex 200 пакт, GE Healthcare уравновешенная PBS, pH 7,4. Фракции, соответствующие альбумину собак 66 кДа собирали, объединяли и концентрировали.

Определение вторичной структуры аллергенов *Can f 1*, *Can f 2*, *Can f 4*, *Can f 5* и *Can f 6*

Для оценки вторичной структуры рекомбинантных аллергенов *Can f 1* – *Can f 6* была использована спектроскопия кругового дихроизма (КД). Измерения проводились на спектрополяриметре Jasco J-810 (Japan Spectroscopic Co., Tokyo, Japan) на базе Венского медицинского университета. Предварительно концентрация белков определялась методом микро BCA (Thermo Fisher Scientific).

Спектральный анализ выполняли в прямоугольных кварцевых кюветках с толщиной оптического пути 0,2 см. Концентрация белков в исследуемых образцах составляла 0,12 мг/мл. Все измерения проводились при температуре 20°C в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4). Спектры регистрировались в диапазоне длин волн 200–240 нм с разрешением 0,5 нм и скоростью сканирования 50 нм/мин.

Для получения окончательных спектров производили фоновую коррекцию путём вычитания сигнала буферного раствора. Дальнейший анализ содержания элементов вторичной структуры белков осуществлялся с использованием программных алгоритмов CONTINLL и CDSSTR на веб-платформе DICHROWEB [3].

Характеристика участников исследования и протокол диагностики

В исследование было включено 100 пациентов в возрасте от 18 до 65 лет с клиническими проявлениями бронхиальной астмы, ринита, конъюнктивита и атопического дерматита, проживающие в Москве и Московской области. Все участники заполнили стандартизированный опросник, составленный на основе переведённых анкет Международного исследования астмы и аллергии у детей (ISAAC), опросника для клинической диагностики аллергического ринита в соответствии с рекомендациями Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (EAACI), а также руководств ARIA.

Перед включением в исследование все пациенты подписали информированное согласие. Забор образцов сыворотки крови проводился на базе Городской клинической больницы № 52 Государственного бюджетного учреждения здравоохранения (г. Москва).

Для всех включенных в исследование пациентов была проведена молекулярная алергодиагностика с определением уровня специфических IgE к аллергенам Can f 1 – Can f 6 с использованием экспериментальной платформы для молекулярной диагностики аллергии «АллергочипРФ». Для приготовления микрочипов на стеклянную подложку иммобилизовали рекомбинантные аллергены Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5, Can f 6 и нативный аллерген Can f 3.

Анализ проводился путем инкубации микрочипов с разведенной сывороткой в течение 2 часов при комнатной температуре во влажной камере, после чего чипы отмывались и осуществлялась инкубация с флуоресцентно-мечеными антителами к человеческим IgE. По завершении процедуры чипы промывали, сушили и сканировали с помощью конфокального лазерного сканера LuxScan 10K. Обработка изображений и количественный анализ проводились с использованием программного обеспечения Microarray Image Analyzer v3.1.2 и MAPIX. Интенсивность флуоресцентного сигнала, соответствующего уровню специфических IgE к компонентам Can f 1 – Can f 6, переводили в стандартизированные единицы (ISU-E). Пороговое значение выше 0,3 ISU-E расценивалось как положительный результат.

Результаты исследования

Получение рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6

Для получения рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 была использована гетерологичная система экспрессии на основе клеток *Escherichia coli*. Химически синтезированные гены соответствующих белков были клонированы в экспрессионные плазмид-

ные векторы с добавлением последовательности, кодирующей гексагистидиновую метку (His₆-tag) на С-конце для последующей очистки методом аффинной хроматографии на никельсодержащей смоле (табл. 1). Наличие целевых вставок подтверждали методом ПЦР с использованием праймеров, специфичных к системе pET. Полученные ампликоны имели следующие размеры: Can f 1 – 661 п.о., Can f 2 – 773 п.о., Can f 4 – 815 п.о., Can f 5 – 1118 п.о., Can f 6 – 866 п.о., что соответствует ожидаемым значениям и подтверждает корректность клонирования (рис. 1). Гены Can f 1 и Can f 5 были клонированы в вектор pET17b и экспрессированы в клетках *E. coli* BL21 Gold (DE3). Ген Can f 2 – в вектор pET22b с экспрессией в *E. coli* Rosetta-Gami B (DE3). Гены Can f 4 и Can f 6 – в вектор pET27b, с экспрессией в *E. coli* BL21 Gold (DE3).

Для экспрессии рекомбинантных аллергенов добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ после чего проводили очистку белков методом аффинной хроматографии. Качество полученных фракций контролировали методом ПААГ-электрофореза (рис. 2, рис. 3). Молекулярные массы аллергенов соответствовали теоретически рассчитанным: Can f 1 – 18,3 кДа, Can

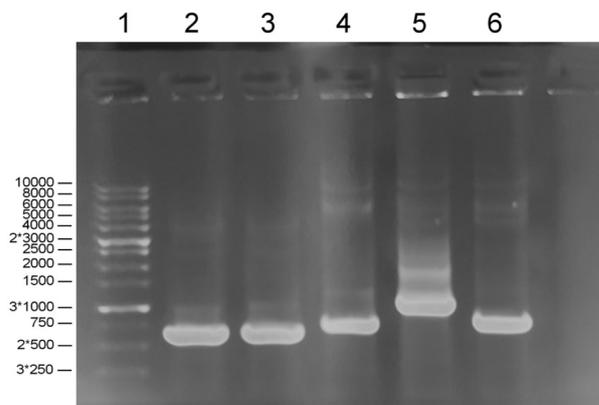


Рис. 1. Агарозный гель электрофорез плазмид Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5, Can f 6

Цифрами обозначены дорожки геля: 1 – маркер молекулярной массы; 2–6 – ампликоны генов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6.

Таблица 1. Параметры клонирования рекомбинантных аллергенов Can f 1 – Can f 6: векторы, штаммы, сайты рестрикции

Синтетический ген	Плазмидный вектор	Сайты рестрикции	Экспрессионный штамм
Can f 1	pET17b	NdeI/XhoI	BL21-Gold (DE3)
Can f 2	pET22b	NdeI/EcoRI	Rosetta-Gami (DE3)
Can f 4	pET27b	NdeI/XhoI	BL21-Gold (DE3)
Can f 5	pET27b	NdeI/EcoRI	BL21-Gold (DE3)
Can f 6	pET27b	NdeI/XhoI	Shuffle T7

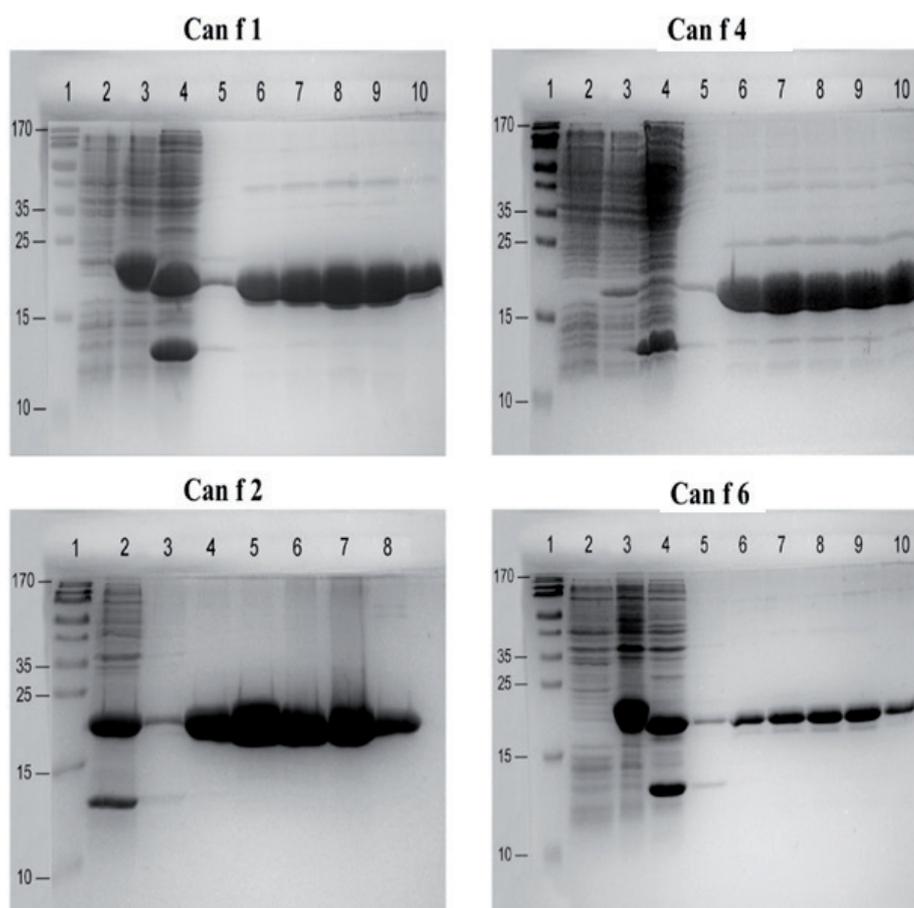


Рис. 2. ПААГ электрофорез фракций рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 6

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

f 2 – 19,3 кДа, Can f 4 – 18,5, Can f 5 – 28 кДа, Can f 6 – 21,1 кДа. Затем фракции объединяли и подвергали диализу в окончательном буфере для хранения.

Оценка вторичной структуры полученных рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6

Вторичная структура рекомбинантных аллергенов Can f 1, Can f 2, Can f 4, Can f 5 и Can f 6 была исследована методом кругового дихроизма. Полученные спектры анализировались с помощью алгоритмов CONTINLL и CDSSTR через онлайн-сервис DICHROWEB, что позволило количественно оценить соотношение элементов вторичной структуры: α -спиралей, β -листов, β -поворотов и неупорядоченных участков.

Can f 1 - аллерген семейства липокалинов продемонстрировал типичное для этого семейства преобладание β -листов (40,7%) при минимальном содержании α -спиралей (5,2%). Доля неупорядоченных участков составила 32,4%, а β -поворотов

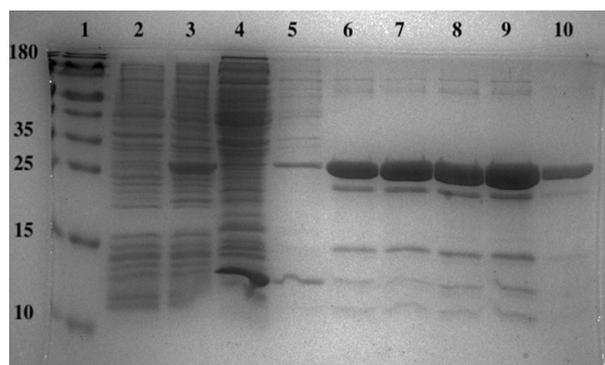


Рис. 3. ПААГ электрофорез фракций рекомбинантного аллергена Can f 5

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

— 21,7%. Эти структурные особенности соответствуют данным Surin и коллег, согласно которым ключевые IgE-эпитопы Can f 1 локализируются в области N- и C-концов молекулы, особенно в районе остатка Arg152 [4].

Can f 2 проявлял более выраженную α -структуру (15,7%) при сопоставимом уровне β -листов (39,0%) и меньшем числе неупорядоченных фрагментов (26,0%). Структура Can f 2, описанная Madhurantakam и соавторами., соответствует классической липокалиновой складке, содержащей консервативный мотив Gly-Хаа-Trp, где Trp19 стабилизирует мономерную конформацию [5]. Несмотря на низкую гомологию с Fel d 4 (менее 22%), Can f 2 демонстрирует перекрёстную IgE-реактивность за счёт сходства в участках 94–104, 122–132 и 134–141.

Can f 4 характеризовался умеренным содержанием β -листов (31,7%) и α -спиралей (10,5%), с выраженным присутствием неупорядоченных сегментов (36,9%). Согласно данным Merja H. Niemi и коллег., этот аллерген способен образовывать нестабильные димеры, что может усиливать его иммуногенность [6]. В отличие от Can f 2, Can f 4 демонстрирует структурные особенности, влияющие на димеризацию и связывание лигандов.

Can f 5 продемонстрировал выраженное преобладание α -спиральной структуры (74,7%) при умеренном содержании β -листов (15,8%) и β -поворотов (9,6%), без присутствия неупорядоченных участков. Это указывает на жёсткую, стабилизированную структуру, отличную от липокалинов.

Can f 6 также имеет типичный липокалиновый профиль: доминирование β -листов (~37,5%), высокая доля неупорядоченных фрагментов (~35–36%) и низкое содержание α -спиралей (~3%). Наличие ~24% β -поворотов указывает на наличие стабилизирующих петель между β -структурами. Структурное сходство с Fel d 4 и Equ s 1 объясняет перекрёстную IgE-реактивность, описанную Yamamoto., и Hilger и коллегами, включая три предполагаемых сайта связывания антител [7,8].

Оценка уровня специфических IgE к панели аллергенов Can f 1 – Can f 6 методом «АллергочипРФ»

В исследование было включено 100 пациентов в возрасте от 18 до 65 лет, имеющие клинические проявления бронхиальной астмы, аллергического ринита, конъюнктивита и атопического дерматита. Исследуемая когорта характеризовалась относительной однородностью по демографическим показателям (возраст, пол) и спектру клинических симптомов, что обеспечивало сопоставимость результатов (табл. 2–4).

Таблица 2. Демографические данные пациентов

Возраст	Количество (N)	Мужчины	Женщины
18-25	20	10	10
26-35	20	10	10
36-45	20	10	10
46-55	20	10	10
56-65	20	10	10

Таблица 3. Клинические данные пациентов (мужчины)

Возраст	Астма	Ринит/ конъюнк- тивит	Дерматит	Пищевая аллергия
18-25	10	10	1	3
26-35	6	10	2	3
36-45	8	10	3	3
46-55	6	10	4	2
56-65	7	10	0	2

Таблица 4. Клинические данные пациентов (женщины)

Возраст	Астма	Ринит/ конъюнк- тивит	Дерматит	Пищевая аллергия
18-25	3	10	4	6
26-35	4	10	6	4
36-45	9	10	0	4
46-55	6	10	1	5
56-65	9	10	0	1

В рамках исследования проводилась оценка уровня специфических IgE к панели молекулярных аллергенов собаки Can f 1 – Can f 6. Пороговое значение, свидетельствующее о наличии сенсibilизации, устанавливалось на уровне $\geq 0,3$ ISU.

По результатам анализа, у 64 из 100 пациентов была выявлена сенсibilизация как минимум к одному из аллергенов. Частота положительных реакций IgE к отдельным компонентам составила: Can f 1 – 72%, Can f 2 – 36%, Can f 3 – 39%, Can f 4 – 50%, Can f 5 – 75%, Can f 6 – 67%. Средние уровни специфических IgE (ISU-E) по аллергенам распределялись следующим образом: Can f 1 – 20,61; Can f 2 – 8,07; Can f 3 – 5,36; Can f 4 – 8,37; Can f 5 – 8,85; Can f 6 – 6,90. Наибольшие медианные значения концентрации специфических IgE были зафиксированы для Can f 1 (4,61 ISU-E), Can f 5 (2,97 ISU-E) и Can f 6 (1,13 ISU-E), что указывает на их ведущую роль в сенсibilизации к эпитопам собаки в исследуемой когорте (табл. 5).

Таблица 5. Статистические показатели уровней специфических IgE к аллергенам Can f 1 – Can f 6 у сенсibilизированных пациентов

Аллерген (ISU-E)	Can f 1	Can f 2	Can f 3	Can f 4	Can f 5	Can f 6
Медиана	4,61	0,00	0,04	0,19	2,97	1,13
Среднее	20,61	8,07	5,36	8,37	8,85	6,90
Квартиль (Q3)	22,98	0,85	2,58	6,82	11,42	6,79
Макс.	180,92	151,89	68,92	73,99	70,19	72,41
Мин.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Проведенный анализ уровня специфических IgE к компонентам Can f 1 – Can f 6 выявил выраженную гетерогенность профиля сенсibilизации. Наиболее высокие значения как медианы, так и среднего уровня IgE зафиксированы для Can f 1 (медиана – 4,61 ISU-E; среднее – 20,61 ISU-E), Can f 5 (2,97 ISU-E; 8,85 ISU-E) и Can f 6 (1,13 ISU-E; 6,90 ISU-E), что отражает преимущественную выраженность IgE-ответа именно к этим компонентам среди сенсibilизированных пациентов (рис. 4). В противоположность этому, уровни специфических IgE к Can f 2, Can f 3 и Can f 4 были существенно ниже (медиана \leq 0,19 ISU-E), хотя в отдельных случаях регистрировались высокие значения, что может свидетельствовать о наличии индивидуальных паттернов сенсibilизации у пациентов. Таким образом, полученные данные согласуются с результатами предыдущих исследований, демонстрирующих ведущую роль компонентов Can f 1, Can f 5 и Can f 6 в структуре сенсibilизации к аллергенам собаки.

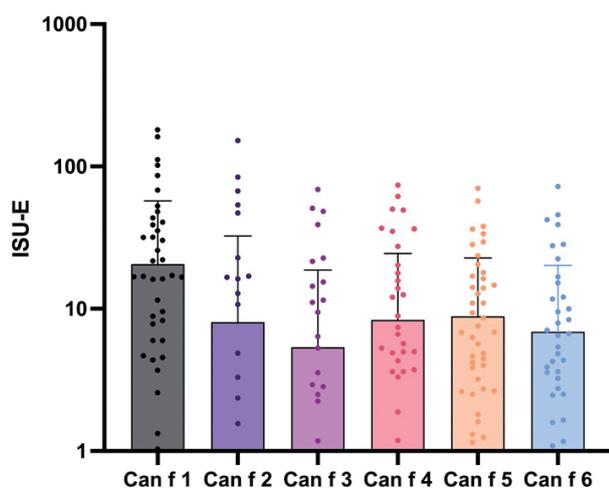


Рис. 4. Уровни специфических IgE (ISU-E) к молекулярным аллергенам собаки Can f 1 – Can f 6 у сенсibilизированных пациентов (n = 64)

Столбчатые диаграммы демонстрируют средние значения концентраций специфических IgE с указанием стандартного отклонения. Для всех компонентов была применена логарифмическая шкала по оси ординат (1–1000 ISU-E).

Обсуждение

Результаты проведенного исследования продемонстрировали выраженную дифференциацию IgE-опосредованного ответа на молекулярные компоненты аллергенов собаки, что позволяет уточнить вклад отдельных белков в формирование профилей сенсibilизации у пациентов с различными клиническими формами аллергопатологии. Наивысшие уровни специфических IgE были зарегистрированы в отношении компонентов Can f 1, Can f 5 и Can f 6, что соответствует данным мультицентровых исследований европейских когорт, в которых указанные молекулы также идентифицированы как мажорные аллергены *Canis familiaris* [9].

Can f 1 продемонстрировал наивысшие показатели среди всех исследуемых компонентов как по медианному значению (4,61 ISU-E), так и по частоте выявления специфических IgE-антител (72%), что подтверждает его статус мажорного аллергена. Эти данные согласуются с результатами Roger A и соавт., где сенсibilизация к Can f 1 наблюдалась более чем у 70 % пациентов с клинической аллергией на собак [10]. Высокая аллергенность Can f 1 обусловлена его принадлежностью к семейству липокалинов, характеризующихся стабильной β -складчатой структурой, способствующей формированию конформационных эпитопов, распознаваемых IgE. Кроме того, Can f 1 демонстрирует высокую степень структурной гомологии с другими липокалинами животных (Fel d 7), что обуславливает перекрестную сенсibilизацию и усиливает его клиническую значимость при поливалентной аллергии [11].

Компонент Can f 5, относящийся к семейству калликреинов и синтезируемый в предстательной железе, был выявлен у 75 % обследованных пациентов и продемонстрировал второе по величине среднее значение IgE (8,85 ISU-E). Эти результаты сопоставимы с данными Basagaña и соавт., согласно которым Can f 5 является ключевым аллергеном у пациентов с изолированной сенсibilизацией к самцам собак, особенно среди женской части популяции [12]. Высокая

иммуногенность Can f 5 может быть связана с аминокислотной гомологией с человеческими калликреинами, в том числе с простатическим специфическим антигеном (PSA), что указывает на потенциальную возможность молекулярной мимикрии и требует дальнейшего структурно-функционального анализа.

Can f 6, также относящийся к липокалинам, показал медианное значение IgE 1,13 ISU-E и положительный результат у 67% пациентов. Его структурное сходство с Fel d 4 и Equ c 1, ранее продемонстрированное в работах Yamamoto и соавт., и Hilger и соавт., подтверждает его значимую роль в развитии перекрестной сенсibilизации к эпителию различных млекопитающих [7,13].

В отличие от вышеуказанных компонентов, Can f 2, Can f 3 и Can f 4 характеризовались существенно более низкими медианными значениями IgE (не превышающими 0,19 ISU-E), несмотря на наличие отдельных пациентов с выраженными уровнями сенсibilизации (например, до 151,89 ISU-E к Can f 2). Это указывает на ограниченную распространенность сенсibilизации к данным молекулам и их потенциальную клиническую значимость лишь в индивидуальных случаях. Can f 2, как липокалин с более низкой частотой выявления, тем не менее, может участвовать в перекрестных реакциях с Fel d 4 [5].

Can f 3 (сывороточный альбумин) представляет интерес в контексте перекрестной сенсibilизации с альбуминами других животных, таких как Fel d 2, Equ c 3 и Bos d 6. В настоящем исследовании специфический IgE к Can f 3 был выявлен у 39% пациентов, что превышает значения, описанные в большинстве европейских популяций, что может отражать региональные особенности аллергенной экспозиции или более высокую частоту множественной сенсibilизации [14].

Аллергокомпонент Can f 4, несмотря на выявление специфического IgE у 50% пациентов, продемонстрировал низкое медианное значение (0,19 ISU-E), что может свидетельствовать о слабой или субклинической реактивности у большинства обследованных лиц. Ранее было

показано, что Can f 4 способен к транзientной димеризации, что потенциально может усиливать его аллергенные свойства [15].

Сопоставление частоты сенсibilизации и уровней специфических IgE к компонентам Can f 1 – Can f 6 позволяет определить иерархию их диагностической значимости в изученной популяции: $Can\ f\ 1 \geq Can\ f\ 5 > Can\ f\ 6 > Can\ f\ 4 > Can\ f\ 3 \approx Can\ f\ 2$. Полученные данные соответствуют современной концепции молекулярного эндотипирования пациентов с аллергией к эпителию собаки и могут служить основой для персонализированного подбора компонентов для аллерген-специфической иммунотерапии.

Заключение

В рамках настоящего исследования были получены и охарактеризованы рекомбинантные формы аллергенов Can f 1 – Can f 6, пригодные для применения в молекулярной диагностике. Вторичная структура белков, подтвержденная методом спектроскопии кругового дихроизма, соответствовала нативным конформациям, что указывает на их корректный фолдинг. Применение диагностического микрочипа «АллергочипРФ» в когорте из 100 пациентов с аллергическими заболеваниями позволило выявить сенсibilизацию к хотя бы одному компоненту аллергенов собак у 64% обследованных. Среди пациентов с сенсibilизацией к собачьим аллергенам, наиболее часто и с наиболее высокими значениями уровней IgE определялись специфические IgE к Can f 1 (72%), Can f 5 (75%) и Can f 6 (67%), тогда как Can f 2, Can f 3 и Can f 4 демонстрировали существенно меньшую частоту положительных реакций и низкие уровни IgE. Результаты подтверждают ведущую роль компонентов Can f 1, Can f 5 и Can f 6 для диагностики аллергии на собаку. Молекулярная аллергодиагностика позволяет уточнить индивидуальный профиль сенсibilизации, улучшить стратификацию пациентов и повысить точность показаний к аллерген-специфической иммунотерапии.

Литература

1. Chan SK, Leung DYM. Dog and Cat Allergies: Current State of Diagnostic Approaches and Challenges. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2018;10(2):97-105. doi:10.4168/aa.2018.10.2.97.
2. Schoos AM, Nwaru BI, Borres MP. Component-resolved diagnostics in pet allergy: Current perspectives and future directions. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147(4):1164-1173. doi:10.1016/j.jaci.2020.12.640.

3. Johnson WC. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins.* 1999;35(3):307-12.
4. Curin M, Weber M, Hofer G, et al. Clustering of conformational IgE epitopes on the major dog allergen Can f 1. *Sci Rep.* 2017;7(1):12135. doi:10.1038/s41598-017-11672-5.
5. Madhurantakam C, Nilsson OB, Uchtenhagen H, et al. Crystal structure of the dog lipocalin allergen Can f 2:

- implications for cross-reactivity to the cat allergen Fel d 4. *J Mol Biol.* 2010;401(1):68-83. doi:10.1016/j.jmb.2010.05.043.
6. Niemi MH, Rytkönen-Nissinen M, Jänis J, et al. Structural aspects of dog allergies: the crystal structure of a dog dander allergen Can f 4. *Mol Immunol.* 2014;61(1):7-15. doi:10.1016/j.molimm.2014.04.003.
 7. Yamamoto K, Ishibashi O, Sugiura K, et al. Crystal structure of the dog allergen Can f 6 and structure-based implications of its cross-reactivity with the cat allergen Fel d 4. *Sci Rep.* 2019;9(1):1503. doi:10.1038/s41598-018-38134-w.
 8. Rytkönen-Nissinen M, Saarelainen S, Randell J, et al. IgE Reactivity of the Dog Lipocalin Allergen Can f 4 and the Development of a Sandwich ELISA for Its Quantification. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2015;7(4):384-92. doi:10.4168/air.2015.7.4.384.
 9. Wintersand A, Asplund K, Binnmyr J, et al. Allergens in dog extracts: Implication for diagnosis and treatment. *Allergy.* 2019;74(8):1472-1479. doi:10.1111/all.13785.
 10. Roger A, Lazo C, Arias N, et al. Using Component-Resolved Diagnosis to Characterize the Sensitization to Specific Cat and Dog Allergens in Patients with Allergic Respiratory Diseases in Catalonia, Spain. *Int Arch Allergy Immunol.* 2023;184(5):440-446. doi:10.1159/000528643.
 11. Apostolovic D, Sánchez-Vidaurre S, Waden K, et al. The cat lipocalin Fel d 7 and its cross-reactivity with the dog lipocalin Can f 1. *Allergy.* 2016;71(10):1490-1495. doi:10.1111/all.12955.
 12. Mattsson L, Lundgren T, Everberg H, et al. Prostatic kallikrein: a new major dog allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(2):362-8. doi:10.1016/j.jaci.2008.11.021.
 13. Nilsson OB, Binnmyr J, Zoltowska A, et al. Characterization of the dog lipocalin allergen Can f 6: the role in cross-reactivity with cat and horse. *Allergy.* 2012;67(6):751-7. doi:10.1111/j.1398-9995.2012.02826.x.
 14. Liu Z, Trifonova D, Tulaeva I, et al. Albumins represent highly cross-reactive animal allergens. *Front. Immunol.* 2023;14:1241518. doi:10.3389/fimmu.2023.1241518.
 15. Niemi M., Rytkönen-Nissinen M., Miettinen I. et al. Dimerization of lipocalin allergens. *Sci Rep.* 2015;5(1):13841. doi:10.1038/srep13841.

Сведения об авторах

Козлов Евгений Максимович – м.н.с. лаборатории иммунопатологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); E-mail: evgenius.kozlov@gmail.com; SPIN-код: 7048-3921; ORCID: 0000-0001-6244-1088.

Трифонова Дарья Романовна – Медицинский университет Вены; Австрия, 1090 Вена, Шпитальгассе, 23; E-mail: d.trifonova@lift.center; ORCID: 0009-0002-4305-0529; SPIN-код: 8534-9820.

Рябова Ксения Александровна – к.м.н., м.н.с. лаборатории иммунопатологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); E-mail: ryabova_k_a@staff.sechenov.ru; ORCID: 0000-0003-0520-0936.

Дубовец Александра Андреевна. – стажер-исследователь ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); E-mail: dubovetsal62@gmail.com; ORCID: 0000-0002-9804-4364.

Винцевская Анастасия Михайловна. – студент ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); E-mail: anastasia.sochi00@gmail.com; ORCID: 0009-0001-6924-5597.

Лукашевич Анастасия Денисовна – студент ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); E-mail: stasyuk12@mail.ru; ORCID: 0009-0009-2254-3608.

Баскаков Алексей Андреевич – студент ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); E-mail: Baskakovalexey@icloud.com; ORCID: 0009-0000-8996-505X.

Фомина Дарья Сергеевна – д.м.н., доцент ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); E-mail: daria.s.fomina@gmail.com; ORCID: 0000-0001-6209-387X; SPIN-код: 3023-4538.

Евсегнеева Ирина Валентиновна – д.м.н., профессор ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); E-mail: evsegneeveva_i_v@staff.sechenov.ru; ORCID: 0000-0002-6624-1363; SPIN-код: 6467-4120.

Караулов Александр Викторович – академик РАН, д.м.н., профессор ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); E-mail: karaulov_a_v@staff.sechenov.ru; ORCID: 0000-0002-1930-5424; SPIN-код: 4122-5565.

Поступила 4.02.2025.