

ИЗУЧЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НА ПРИМЕРЕ МАЖОРНЫХ ПЫЛЬЦЕВЫХ АЛЛЕРГЕНОВ BET V 1 БЕРЕЗЫ И ALN G 1 ОЛЬХИ

А.Е. Потапов, Д.Н. Мельникова, Т.В. Овчинникова, И.В. Богданов

Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

На сегодняшний день аллергия стала одним из наиболее распространенных заболеваний. Ввиду этого исследование процессов сенсибилизации к аллергенам и поиск путей лечения этого заболевания являются актуальной задачей. Сенсибилизация заключается в первичной выработке аллерген-специфических IgE иммунной системой при контакте с аллергеном. Этот механизм изучен для протеазных аллергенов. В отличие от них, процесс сенсибилизации к неферментативным белкам, включая гомологов мажорного аллергена березы Bet v 1, исследован недостаточно. Многие гомологи Bet v 1 являются клинически значимыми аэроаллергенами. Контролировать реакции на них сложнее, чем при пищевой аллергии, где возможна элиминационная диета. Характерная структурная особенность гомологов Bet v 1 — гидрофобная полость, связывающая липидные лиганды. Последние данные свидетельствуют, что это взаимодействие может быть значимо для сенсибилизации, потенциально влияя на процессинг и/или иммунный ответ. Исходя из всего вышесказанного, объектами данного исследования были выбраны пыльцевые аллергены ольхи Aln g 1 и березы Bet v 1.

Для основного аллергена пыльцы ольхи Aln g 1 нами ранее была показана способность к независимой сенсибилизации на Т-клеточном уровне. Несмотря на важность этого этапа для приобретения чувствительности организмом человека, не менее важным представляется прохождение через эпителий. Для изучения взаимодействия пыльцевых аллергенов с эпителием нами был разработан способ получения рекомбинантных аналогов Aln g 1 и Bet v 1 с использованием клеток *E. coli* BL21(DE3). Очистка рекомбинантных белков включала: выделение из телец включения, металлохелатную хроматографию, диализ и обращенно-фазовую ВЭЖХ. Гомогенность полученных аллергенов была подтверждена с использованием методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и SDS-электрофореза в ПААГ. При контактировании с организмом на первом этапе аэроаллергены сталкиваются с сурфактантом — сложной смесью, состоящей преимущественно из липидов. Используя модельные липосомы DPPC/DOPC/DOPG/DOPE с кальцеином, мы продемонстрировали, что оба аллергена способны вызывать повреждения липосом, однако Bet v 1 был более эффективен. Далее, для оценки способности прохождения аллергенов через эпителий использовалась клеточная линия Calu-3. Рост культуры производился на проницаемых вставках, обеспечивающих поляризацию клеток при формировании монослоя, моделируя реальный эпителиальный барьер. Сами белки подвергались мечению при помощи FITC (флуоресцин изотиоционат). В результате, оба аллергена были способны проникать сквозь поляризованный эпителиальный слой, а значимого отличия между ними выявлено не было. Отношение прямого к обратному транспорту составило $28,8 \pm 3$ и $30,5 \pm 2,2$ для Aln g 1 и Bet v 1, соответственно. Поэтому, основываясь на представленных высоких коэффициентах поглощения обоих аллергенов (>20), мы предполагаем, что перенос аллергенов через монослой Calu-3 является активным. Известно, что аллергены растительного происхождения способны активировать синтез проаллергенных и провоспалительных цитокинов эпителиальными клетками. Поэтому, методом ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green было показано увеличение экспрессии генов *TSLP*, *IL33*, *IL1B* и *CXCL8* через 6 и 24 часа, но не через 2 часа. При этом, для Aln g 1 изменения были больше, чем для Bet v 1, но не значимо ($p > 0.05$). Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу активного механизма транспорта, при этом, демонстрируя, вероятно, важность контакта аллергена с эпителием для иммунного ответа организма.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда
(проект № 23-75-10116; <https://rscf.ru/project/23-75-10116/>)*

СОЗДАНИЕ МЫШИНЫХ МОДЕЛЕЙ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ МАЖОРНЫМ АЛЛЕРГЕНОМ СОИ GLY m 4

И.В. Богданов, Е.И. Финкина, Т.В. Овчинникова

ФГБУН ГНЦ РФ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия

Аллергия на сою, опосредованная аллергеном сои Gly m 4, относящимся к классу PR-10, остается малоизученной, несмотря на её клиническую значимость, особенно у пациентов с сенсibilизацией к Bet v 1 пыльцы берёзы. Традиционно считается, что многие аллергены класса PR-10 выступают в первую очередь в качестве перекрёстных с Bet v 1 берёзы аллергенов, обладая ограниченным собственным сенсibilизирующим потенциалом. Однако в последние годы стали появляться исследования, свидетельствующие в пользу того, что сенсibilизационный потенциал аллергенов данного класса может быть недооценён. Цель данного исследования заключалась в оценке способности Gly m 4 сои индуцировать аллергическую сенсibilизацию в мышиных моделях при различных путях введения (внутрибрюшинном (i.p.), подкожном (s.c.), интраназальном (i.n.)) с адьювантами (алюминия гидроксид (алюм) и липополисахарид (LPS)) и без них.

Рекомбинантные аллергены Gly m 4 и Bet v 1 были получены методом гетерологичной экспрессии в штамме ClearColi® BL21(DE3), свободном от бактериальных эндотоксинов. Для исследования были использованы самки инбредных мышей линии BALB/c возрастом 6-8 недель, содержащиеся в барьерных условиях SPF (specific pathogen free). Животные были разделены на 10 групп (n=5), включая контрольные группы PBS и адьюванта алюм. Основные группы получали подкожные или внутрибрюшинные инъекции 5 мкг Gly m 4 с адьювантом (1 мг гидроксида алюминия) или без него по схеме: сенсibilизация в дни 0, 14, 28 и 42. Для сравнения использовали группы, сенсibilизированные подкожно или внутрибрюшинно Bet v 1 по аналогичному протоколу. Отдельные группы получали интраназальные введения аллергена Gly m 4 (20 мкг/мышь) с LPS (20 нг/мышь) или без него 6 раз с интервалом в 7 дней. На 49 и 51 день все животные получили провокационную дозу 100 мкг аллергена на мышь с оценкой системной анафилаксии по 5-балльной шкале. Серологические исследования выявили значительное повышение уровней аллерген-специфических IgE и IgG1 у мышей, сенсibilизированных Gly m 4, причем подкожный путь введения показал наибольшую эффективность. Интересно, что даже без адьюванта Gly m 4 вызывал Th2-ответ, хотя и менее выраженный. В группах с Bet v 1 наблюдали сходный профиль антител, но с более высоким уровнем IgG2a, что указывает на различия в иммуногенности этих PR-10 белков. Тест высвобождения β-гексозаминидазы из клеток линии RBL-2H3 подтвердил функциональную активность IgE-антител: сыворотки от мышей, сенсibilизированных Gly m 4 i.p. и s.c. с адьювантом и без, вызывали дозозависимое высвобождение фермента. Мультиплексный анализ 48 цитокинов и хемокинов выявил существенные различия в иммунных профилях. Внутрибрюшинное введение Gly m 4 с адьювантом приводило к значительному повышению IL-5 (в 4.2 раза), IL-13 (в 3.8 раза) и CCL11 (в 5.1 раза) по сравнению с контрольной группой ($p<0.05$). При этом в группах без адьюванта наблюдали умеренное увеличение IL-13 (в 1.9 раза) и GM-CSF (в 1.5 раза) на фоне снижения провоспалительных цитокинов (IL-1α и IL-6).

Полученные результаты демонстрируют, что Gly m 4 обладает выраженным собственным сенсibilизирующим потенциалом. Выявленные особенности иммунного ответа (смешанный Th1/Th2 профиль, различия в эффективности путей сенсibilизации) имеют важное значение для разработки моделей пищевой аллергии и стратегий аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ).

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект №23-75-10116).