



РОССИЙСКАЯ АССОЦИАЦИЯ АЛЛЕРГОЛОГОВ
И КЛИНИЧЕСКИХ ИММУНОЛОГОВ (РААКИ)



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
«ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

Труды Международного форума

«КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ И АЛЛЕРГОЛОГИЯ — МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЕ ПРОБЛЕМЫ»

**(14—17 мая 2014 г.,
Казань)**

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА АЛЛЕРГОКОМПОНЕНТОВ БЕЛКА ЯЙЦА

Сейлиева Н. А., Верлыго Е. А.

ООО «Вега» Группа Компаний «Алкор Био», г. Санкт-Петербург

PURIFICATION AND PROPERTIES OF EGG WHITE ALLERGEN COMPONENTS

Seylieva N. A., Verlygo E. A.

Vega Ltd. Group of Companies "Alkor Bio"

Пищевая аллергия — это клинические проявления повышенной чувствительности организма к пищевым агентам, в основе которых лежат иммунологические механизмы. Эта проблема серьезно влияет на качество жизни примерно 4% детей и их семей по всему миру. Большая часть пищевой аллергии опосредована иммуноглобулином E и характеризуется реакцией гиперчувствительности первого типа. Как правило, IgE-зависимые реакции развиваются через 2 часа после приема пищи с широким спектром симптомов, от легких реакций, таких как зуд или крапивница, до таких серьезных, угрожающих жизни состояний, как анафилактический шок. Распространенность пищевой аллергии составляет не менее 1–2% и не более 10% в общей популяции [1].

Диагностика пищевой аллергии основана на данных анамнеза в сочетании с кожными тестами и/или *in vitro* тестированием. Тест *in vitro* заключается в измерении уровня иммуноглобулина класса E (IgE) к специфическим антигенам по принципу иммунохимического анализа. Несмотря на широкое распространение и высокую чувствительность, данный тест имеет существенные недостатки, например, невысокую специфичность анализа, наличие расхождений с результатами кожных проб, наличие положительных результатов тестирования при отсутствии чувствительности и т.д. [2]. Основным источником такого рода проблем является применение в диагностических тест-системах экстрактов, полученных из природных источников. Экстракты представляют собой сложные смеси, содержащие в составе помимо аллергенных белков, неактивные белки и другие балластные вещества. Причём активные аллергенные белки зачастую являются всего лишь минорным компонентом суммарной белковой фракции. Очевидно, что такие экстракты плохо поддаются стандартизации из-за их различий в химическом составе природного сырья и методах получения экстрактов. Кроме того, аллергенные белки, выделенные из различных природных источников, (пыльца, фрукты, шерсть животных и т.п.), могут иметь сходную структуру, а значит, вызывать схожие аллергические реакции. Такая кросс-реактивность также затрудняет точную идентификацию источника аллергической реакции и постановку диагноза.

Значительно улучшить специфичность и другие аналитические параметры существующих тест-систем

для *in vitro* аллергодиагностики может применение вместо суммарных белковых экстрактов индивидуальных аллергенных белков, так называемых, аллергокомпонентов [3]. Такие индивидуальные аллергенные белки могут быть получены как путем выделения из природных источников (натуральные высокоочищенные аллергены), так и при помощи молекулярно-биологических методов (рекомбинантные аллергены) [4]. Следует отметить, что индивидуальные аллергокомпоненты представляют также большой интерес для аллергоспецифической иммунной терапии (АСИТ) [5].

Ранее в группе компаний «Алкор Био» начаты работы, направленные на создание панели индивидуальных аллергокомпонентов и тест-систем для аллергодиагностики *in vitro* на их основе [3, 4]. Целью данной работы являлось получение аллергокомпонентов белка яйца и исследование их иммунологических свойств.

Известно, что яйца являются важным компонентом в питании человека и в то же самое время одним из основных пищевых аллергенов [6–8]. Среди обследованных детей с атопическим дерматитом около 35,5% имеют аллергию к яйцу, тогда как среди взрослых с аллергией к пище около 12% реагируют на яйца [9]. В настоящее время описаны 4 аллергена яичного белка: овальбумин (Gal d 2, 54% от общего белка яйца), кональбумин, также известный под названием овотрансферрин (Gal d 3, 12%), овомукоид (Gal d1, 11%) и лизоцим (Gal d 4, 3%) [10]. Суммарно эти аллергокомпоненты составляют около 80% от общего белка [10]. Следует отметить, что овальбумин и овомукоид относятся к термостабильным белкам и сохраняют свои аллергенные свойства даже после термической обработки яйца. В аллергодиагностике овомукоид- и овальбумин-специфические IgE рекомендованы к применению в качестве маркеров аллергии к приготовленному яйцу, что позволяет врачу определить необходимость назначения строгой диеты [11]. Лизоцим широко используется как антибактериальная добавка в пищевой промышленности и может являться причиной пищевой аллергии [10].

На первом этапе исследования водный раствор белка яйца был подвергнут разделению с помощью жидкостной анионообменной хроматографии (Akta Explorer Air 100, GE Healthcare Inc). В результате была

выделена фракция, содержащая овальбумин, кональбумин и овомукоид. Последующая разделение с помощью катионообменной хроматографии позволила выделить индивидуальный кональбумин, а также фракцию, содержащую овальбумин и овомукоид. Отделение овомукоида от овальбумина проводили осаждением трихлоруксусной кислотой по стандартной методике.

Лизоцим выделяли из водного экстракта с помощью гель-фильтрационной хроматографии.

Состав полученных фракций и степень их очистки анализировали на электрофореze относительно референсных белков (Indoor biotechnologies).

Изучение иммунологических свойств полученных белков было выполнено на индивидуальных сыворотках крови 18 пациентов с помощью набора «АллергоИФА-специфические IgE» (ООО «Компания Алкор Био»). Контрольные сыворотки, не имеющие аллерген-специфических IgE к яйцу (препарат f245, Phadia), а так же референсные сыворотки с повышенным уровнем аллерген-специфических IgE к компонентам белка яйца (препараты f233, f232 и k208, Phadia) были охарактеризованы при помощи анализатора Phadia 100 (Phadia).

В ходе проведенного анализа для компонентов овальбумин (Gal d 2) и лизоцим (Gal d 4) показаны 100% чувствительность и специфичность. Для компонента овомукоид (Gal d 1) показаны 100% специфичность и незначительное расхождение в чувствительности, не превышающее 1 класс. Аллергокомпонент кональбумин (Gal d 3) в настоящее время проходит тестирование иммунологических свойств.

Таким образом, нами были получены аллергокомпоненты яйца овомукоид, овальбумин и лизоцим, подтверждены их иммунологические свойства, что позволяет использовать их для определения специфических IgE в образцах сыворотки крови.

В настоящее время ведутся работы по выделению и расширению панели аллергокомпонентов.

Литература

1. Chafen J. J., Newberry S. J., Riedl M. A., et al. Diagnosing and managing common food allergies: a systematic review. JAMA. 2010, v. 303, p. 1848–56.
2. А. Е. Павлов, Н. А. Сейлиева, В. Е. Стефанов. Перспективы развития молекулярной диагностики аллергии в формате микрочипа. Клиническая лабораторная диагностика, 2011, № 12, с. 3–7.
3. Kattan J. D., Wang J. Allergen component testing for food allergy: ready for prime time? 2013, v.13, p. 58–63.
4. А. Е. Павлов, Н. А. Сейлиева, О. Ю. Мухортых, В. Е. Стефанов. Получение и оценка свойств рекомбинантного аналога мажорного аллергена пыльцы березы Betv 1. Российский аллергологический журнал, 2012, № 3, с. 7–13.
5. Asero R. Component-resolved diagnosis-assisted prescription of allergen-specific immunotherapy: a practical guide. Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol. 2012, v. 44, n.5, p. 183–187
6. Zukiewicz-Sobczak W.A., Wróblewska P., Adamczuk P., Kopczyński P. Causes, symptoms and prevention of food allergy. Postepy Dermatol. Alergol. 2013, v. 30, p. 113–116.
7. Rona R. J., Keil T., Summers C., et al. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. J. Allergy Clin. Immunol. 2007, v. 120, p. 638–646.
8. Yunginger J. W. Classical food allergens. Allergy Asthma proc. 1990, v. 11, 7–9.
9. Wüthrich B. Lethal or life-threatening allergic reactions to food. J. Invest. Allergy Clin. Immunol. 2000, v. 10, p. 59–65.
10. Mine Y., Yang M. Recent advances in the understanding of egg allergens: basic, industrial, and clinical perspectives. J. Agric. Food Chem. 2008, v. 56, p. 4874–4900.
11. Ando H., Movérare R., Kondo Y., et al. Utility of ovomucoid-specific IgE concentrations in predicting symptomatic egg allergy. J. Allergy Clin. Immunol. 2008, v. 122, p. 583–588.