



БЕЛКОВЫЙ ПРОФИЛЬ И АЛЛЕРГЕННЫЕ СВОЙСТВА ТРОПОМИОЗИНА И ДРУГИХ АЛЛЕРГОКОМПОНЕНТОВ В СОСТАВЕ ВОДНО-СОЛЕВОГО ЭКСТРАКТА ГИГАНТСКОЙ ТИГРОВОЙ КРЕВЕТКИ (*Penaeus monodon*)

© 2023 г. В. М. Бержец*, Г. И. Алаторцева*, Л. Н. Нестеренко*, С. В. Хлгатын*, С. Ю. Петрова*[#], Н. С. Петрова*, А. В. Васильева*, Л. А. Пищулина*, О. Ю. Емельянова*

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации,
Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5а

Поступила в редакцию 27.11.2022 г.

После доработки 10.12.2022 г.

Принята к публикации 11.12.2022 г.

Несмотря на успехи в идентификации новых аллергенов ракообразных, отличных от тропомиозина, многие потенциальные аллергены остаются неидентифицированными. В настоящее время на российском рынке отсутствуют диагностические и лечебные аллергены ракообразных, в том числе тропомиозин беспозвоночных. Цель данного исследования – изучение аллергенных свойств тропомиозина и других белков водно-солевого экстракта из гигантских тигровых креветок (*Penaeus monodon*). Аллергенные экстракты готовили из сырого и вареного мяса тигровых креветок *P. monodon*. Для выявления специфической активности экспериментальных аллергенов использовали сыворотки пациентов с сенсibilизацией к ракообразным. Содержание специфических IgE в сыворотках составляло 3.50–17.49 МЕ/мл, что соответствует 3-му классу активности. С образцами аллергенов сырых и вареных креветок проводили ИФА и электрофорез в ПААГ с последующим вестерн-блоттингом с наиболее аллерген-специфичной сывороткой. Показано, что экстракты из сырых и вареных креветок обладают аллергенной активностью (связывают IgE). Термическая обработка креветок не оказывала влияния на изменение аллергенной активности экстрактов, кроме одного образца, у которого была обнаружена сильная реакция с антигенами из экстракта вареных креветок. Доказано, что подобранные условия экстрагирования позволяют выявлять многофракционный характер белкового профиля экстрактов сырых и вареных креветок. В вестерн-блоттинге экстракт из сырых креветок имел слабую реакцию, причем тропомиозин вообще не был выявлен. В то же время в препарате вареных креветок определено пять белковых компонентов, активно реагирующих с IgE-антителами пациента, страдающего аллергией к ракообразным. Полученные данные позволят расширить знания об аллергии к ракообразным и продолжить исследования по определению оптимальных условий очистки аллергенов креветок.

Ключевые слова: тропомиозин, аллергены ракообразных, *Penaeus monodon*, паналлергены, вестерн-блоттинг

DOI: 10.31857/S0132342323050111, **EDN:** BQJLKL

ВВЕДЕНИЕ

Аллерген – многокомпонентная система, включающая несколько белков. Белки, имеющие доказанную аллергенную активность, называют аллергокомпонентами. Формирование сенсibilизации к отдельным белкам пищевого аллергена различно, что обуславливает выделение мажорных и минорных аллергокомпонентов [1–3].

При кожном тестировании и в прик-тестах используются нативные многокомпонентные экс-

тракты того или иного вида аллергенов [1]. При необходимости выявления аллергокомпонента, вызывающего аллергическую реакцию, проводят молекулярную аллергодиагностику. Данное исследование позволяет определить основной аллергенный триггер, прогнозировать возможную перекрестную реактивность, индивидуально назначать лечебное питание и аллерген-специфическую иммунотерапию [4, 5].

Молекулы аллергенов классифицируются по семействам белков в зависимости от их структуры и биологической функции. У различных молекул могут быть общие эпитопы (антиген-связывающие сайты), а одни и те же IgE-антитела способны взаимодействовать с молекулами аллергенов,

Сокращения: IgE – иммуноглобулин E; ФСБ-Т – 0.02 М фосфатный буфер (рН 7.2), содержащий 0.05% Tween 20.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (916) 463-32-97; эл. почта: petrovastanislava@yandex.ru).

имеющими сходную структуру, но различное происхождение. Изучение таких перекрестно-реагирующих аллергенов предоставляет ценную информацию о сенсибилизации к разным объектам [4]. И, напротив, некоторые молекулы – уникальные маркеры специфических аллергенов, что позволяет идентифицировать причинно-значимый аллерген. Перекрестно-реагирующий антиген, относящийся к белковому семейству, обнаруживаемый у дальнородственных видов биологических объектов, имеющий высококонсервативную структуру и способный инициировать связывание с антителами изотипа IgE, называют паналлергеном. Паналлергены нередко служат причиной перекрестной сенсибилизации к различным продуктам питания, а также к пыльцевым, бытовым и эпидермальным аллергенам. Механизм формирования перекрестной сенсибилизации связан с высокой идентичностью в организации IgE-связывающих эпитопов белков разных групп аллергенов, что позволяет им перекрестно реагировать со специфическими IgE друг друга. Один из паналлергенов животного происхождения – тропомиозин беспозвоночных [1, 6–8].

Тропомиозин представляет собой миофибриллярный белок с молекулярной массой 34–38 кДа, это наиболее распространенный аллерген ракообразных. Одинаковые последовательности аминокислот в составе тропомиозина моллюсков, ракообразных, а также клещей домашней пыли и тараканов свидетельствуют о высокой консервативности данного белка. При контакте с аллергенами клещей домашней пыли и при употреблении морепродуктов может возникнуть гиперчувствительность к тропомиозину, что вызывает тяжелые системные и местные аллергические реакции. Тропомиозин относится к термостабильным белкам, устойчивым к нагреванию и гидролизу. Его аллергенные свойства не исчезают даже после кулинарной обработки [1, 9].

Помимо тропомиозина существуют и другие белки-аллергены в классе ракообразных, наиболее известные из них – аргининкиназа (40 кДа) [10], легкая цепь миозина (20 кДа) [11] и саркоплазматический кальций-связывающий белок (SCP) (20 кДа) [6]. В отличие от тропомиозина, SCP проявляет перекрестную реактивность только между ракообразными. Pibooprosanun et al. в 2011 г. [12] сообщили о гемоцианине гигантской речной креветки *Macrobrachium rosenbergii*, выявленном в гемолимфе ракообразных, где он транспортирует кислород [9].

На современном этапе обнаружено еще ~39 незарегистрированных аллергенов у различных видов креветок, включая белок теплового шока HSP70, α -тубулин, химотрипсин (термостабилен), циклофилин, β -энолазу, альдолазу А и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу. Практиче-

ски все выявленные белки имеют высокую гомологию не только с белками ракообразных, моллюсков, домашних пылевых клещей и тараканов, но и рыб (β -энолаза и альдолаза А), грибов *Aspergillus fumigatus* и растений *Triticum aestivum* (циклофилин и G3PD). Вышеизложенное, безусловно, может свидетельствовать о разнонаправленной перекрестной реактивности аллергенов креветок [13].

Несмотря на успехи в идентификации новых аллергенов ракообразных, отличных от тропомиозина, многие потенциальные аллергены остаются неидентифицированными.

В настоящее время на российском рынке отсутствуют высокоочищенные аллергены ракообразных (в том числе тропомиозин беспозвоночных), предназначенные для постановки кожных аллергопроб и проведения аллерген-специфической иммунотерапии. Изучение перекрестно-реагирующих аллергенов может расширить информацию о перекрестной сенсибилизации к разным объектам и уменьшить количество диагностических тестов [4].

Цель данного исследования – изучение аллергенных свойств тропомиозина и других белков водно-солевого экстракта гигантских тигровых креветок *Penaeus monodon*, а также идентификация аллергенов из тигровых креветок *P. monodon*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Водно-солевые экстракты аллергенов. Технология приготовления водно-солевых экстрактов аллергенов из сырых и вареных креветок была основана на ранее разработанном способе получения водно-солевых экстрактов из клещей домашней пыли [14]. В полученном экстракте из сырых креветок содержание белкового азота по Несслеру составило 27 500 PNU, из вареных креветок – 11 200 PNU. Концентрация белка по методу Бредфорд в полученных экстрактах составила 113 и 60 мкг/мл соответственно.

Иммуноферментный анализ. ИФА проводили с сыворотками четырех пациентов, страдающих аллергией к ракообразным. В лунки планшета сорбировали следующие образцы: 1) аллерген из сырых креветок, 2) аллерген из сырых креветок после концентрирования и ультрафильтрации, 3) аллерген из вареных креветок, 4) аллерген из вареных креветок после концентрирования и ультрафильтрации.

Показано, что экстракты из сырых и вареных креветок связывают IgE, т.е. обладают аллергенной активностью (табл. 1). Термическая обработка креветок не оказывала влияния на аллергенную активность экстрактов. Однако в ИФА с одной из четырех исследованных сывороток (477+) выявлена наиболее выраженная реакция с анти-

Таблица 1. Выявление специфических IgE-антител к белку тропомиозину в экстрактах из сырых и вареных тигровых креветок (*P. monodon*) методом ИФА

Рабочие названия сывороток	ОП ₄₅₀ (Cut-off = 0.04), о.е./мл			
	сырые креветки		вареные креветки	
	до обработки	после обработки*	до обработки	после обработки*
477+	0.183	0.165	1.550	1.877
1X	0.154	0.143	0.064	0.060
2–	0.138	0.116	0.041	0.060
3–	0.125	0.106	0.036	0.071

* Фильтрация и концентрирование препаратов с пределом исключения белков массой 10 кДа с последующим разведением полученного материала до 5 мкг/мл.

генами из экстракта вареных креветок. Также было выявлено незначительное усиление реакции антиген–антитело после обработки препаратов (фильтрации и концентрирования с пределом исключения белков массой 10 кДа).

Исходя из полученных результатов, в вестерн-блоттинге использовали сыворотку 477+ с высоким титром аллерген-специфических антител.

SDS-PAGE по Лэмбли. Использование продуктов экстракции аллергенов из сырых и вареных креветок позволило оценить их белковый профиль. Анализ экстрактов сырых креветок до и после концентрирования выявил большее количество белковых фракций (~12), чем в экстракте вареных креветок (~5). Полученная нами электрофореграмма белкового профиля водно-солевого экстракта сырых креветок (рис. 1а, дорожки 1 и 2) соответствует профилю аллергенов гигантских тигровых креветок *P. monodon*, представленному в литературе [15]. На электрофореграмме в образцах сырых креветок представлены фракции 38 и 39–40 кДа, по-видимому, соответствующие тропомиозину и аргининкиназе, 41–46 кДа – β-актину, 50 кДа – α-тубулину, 75 кДа – гемоглобину и высокомолекулярные фракции, вероятно, соответствующие белку, подобному гликогенфосфорилазе (95 кДа), и парамиозину (100 кДа). Низкомолекулярные фракции: легкая цепь миозина (20 кДа) и саркоплазматический кальций-связывающий белок (20 кДа) – не визуализировались. Электрофореграмма образцов вареных креветок (рис. 1а, дорожки 3 и 4) отличается по белковому профилю. Некоторые белки в диапазоне 40–100 кДа не визуализировались на электрофореграмме, что, по-видимому, связано с их денатурацией в результате термической обработки. На профиле образцов из вареных креветок наиболее выраженные полосы соответствуют фракциям 27–30 и 99–100 кДа. Менее заметны на электрофореграмме белки 38 кДа (тропомиозин), 40 кДа (аргининкиназа) и 95 кДа (белок, подобный гликогенфосфорилазе) [13, 15].

Анализ белковых фракций после концентрирования и ультрафильтрации выявил более выраженные и четкие полосы в образцах сырых креветок в отличие от образцов вареных креветок (рис. 1а, дорожки 7 и 8). Кроме того, необходимо отметить незначительные потери белков в ультрафильтрате данных аллергенов (рис. 1а, дорожки 5 и 6).

Вестерн-блоттинг. Вестерн-блоттинг проводили с исследуемыми экстрактами сырых и вареных креветок, прошедшими ультрафильтрацию и концентрирование. Примечательно, что в иммуноблоттинге с сыворотками пациентов со специфическими антителами в образцах сырых креветок определялись только высокомолекулярные белки с молекулярными массами ~75, 95 и 100 кДа, обладающие невысокой аллергенной активностью. В то же время с помощью тех же сывороток в образцах вареных креветок выявлены белки 100, 55–60, 40, 38 и 27–31 кДа, причем фракция белка 27–31 кДа имеет высокую антигенную активность (рис. 1б).

Аллергия на морепродукты из беспозвоночных: ракообразных (креветки, крабы, лобстеры, раки, омары), моллюсков (кальмары, осьминоги, гребешки, улитки, устрицы, мидии и др.) – достаточно распространена. Основной способ приготовления креветок – отваривание, однако, согласно данным литературы, аллергенная активность креветок при термической обработке не снижается, а в некоторых случаях даже повышается [16]. В литературе имеются и иные данные. Так, Liu et al. показали с помощью ИФА, что экстракты сырых креветок имеют более высокое связывание IgE, чем экстракты вареных креветок. Однако результаты дот-блоттинга указывали на более высокое связывание IgE с очищенным тропомиозином из вареных креветок, чем из сырых [17]. Необходимо отметить, что технология приготовления экстракта как очищенных, так и вареных креветок в цитируемой работе значительно отличалась от используемой нами. Влияние кипячения на реактивность креветок согласуется с результатами Carnes et al., которые также обнаружили, что экстракты вареных креветок были бо-

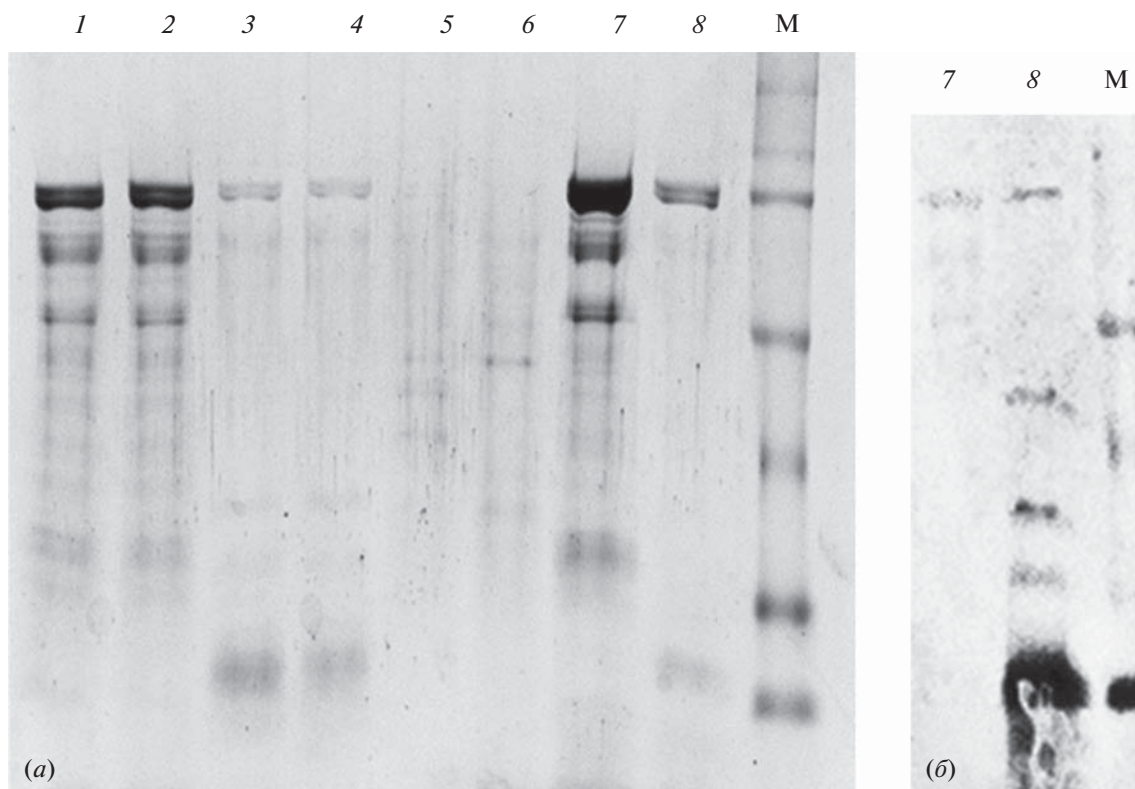


Рис. 1. Результаты электрофореза в 10%-ном ПААГ (а) и вестерн-блоттинга (б) препаратов сырых (113 мкг/мл) и вареных (60 мкг/мл) тигровых креветок (*P. monodon*) до и после концентрирования: (а) – 1 и 2 – сырые креветки, 3 и 4 – вареные креветки, 5 – ультрафильтрат сырых креветок, 6 – ультрафильтрат вареных креветок, 7 – препарат сырых креветок (концентрат); 8 – препарат вареных креветок (концентрат), М – маркер молекулярных масс (сверху вниз): 250, 150, 100, 75, 50, 37 и 25 кДа; (б) – 7 – препарат сырых креветок (концентрат), 8 – препарат вареных креветок (концентрат), М – маркер молекулярных масс (сверху вниз): 100, 75, 50, 37 и 25 кДа.

лее реактивными как в исследованиях *in vivo*, так и в результатах, полученных *in vitro* методом прямого ИФА [18].

Вышеизложенные результаты ИФА были подтверждены вестерн-блоттингом. Определено пять белков, реагирующих с IgE-антителами пациента, страдающего аллергией к ракообразным. В отличие от экстрактов из вареных креветок, экстракт из сырых креветок показывал слабую реакцию, причем тропомиозин вообще не был выявлен. Среди термостабильных белков, согласно данным литературы, были идентифицированы параамиозин (100 кДа), аргининкиназа (40 кДа) и тропомиозин (38 кДа). Белок 55–60 кДа не определен в связи с отсутствием доступных литературных данных. В зарубежной литературе имеются публикации об идентификации у тигровой креветки 44 аллергенов, что свидетельствует о значительном многообразии минорных аллергенов даже в термостабильном спектре белка. Всего в настоящее время обнаружено семь термостабильных белков у гигантской черной тигровой креветки [19]. Яркое пятно в области 27–31 кДа на электрофореграмме образцов вареных креветок, вероятно, может свиде-

тельствовать о скоплении денатурированных белковых фрагментов, образовавшихся после термической обработки. Необходимо отметить, что белки сохранили аллергенную активность даже после потери конформационной структуры.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Все реактивы были высокой степени очистки: 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, компоненты буферных растворов (Sigma, Fluka, Helicon, США), конъюгат стрептавидин–пероксидаза (Sigma, США), антитела против IgE, меченные биотином (RIDA® AllergyScreen, США).

Растворы готовили на деионизированной воде (Milli-Q System, Millipore, США). Для проведения ИФА использовали 96-луночные планшеты для иммунологических исследований (Costar, США). Планшеты инкубировали на термостатируемом планшетном встряхивателе (Eppendorf, Германия). Концентрирование препаратов проводили в ячейках для ультрафильтрации Amicon Ultra-15 Ultracel 10K (Sigma-Aldrich, США) с пределом исключения 10 кДа. Состав препаратов изучали с

применением прибора для электрофореза Mini-Protean Tetra Cell System, прибора для переноса Transfer System Trans-Blot Turbo и прибора для визуализации гелей Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, США).

Серологический материал. Для выявления специфической активности экспериментальных аллергенов из сырых и вареных креветок *P. monodon* использовали образцы сывороток крови четырех пациентов, прошедших наблюдение в Клинико-диагностическом центре НИИВС им. И.И. Мечникова, с аллергией к ракообразным. С помощью метода RIDA® AllergyScreen (R-Biopharm AG, Германия) подбирали сыворотки с установленной степенью активности (3-й класс), что соответствует содержанию специфических IgE, равному 3.50–17.49 МЕ/мл.

Получение водно-солевых экстрактов аллергенов. Технология приготовления водно-солевых экстрактов аллергенов из сырых и вареных креветок была основана на ранее разработанном способе получения водно-солевых экстрактов из клещей домашней пыли [14].

Тигровые креветки вида *Penaeus monodon* фирмы ARK Sea Foods Ltd. были получены от ООО “Альянс-СПБ” (г. Санкт-Петербург, Россия) в замороженном виде. Прошли дополнительную фенотипическую экспертизу по видовой принадлежности у д.б.н. профессора В.М. Бержец и к.б.н. О.Ю. Емельяновой. Креветки размораживали при 5°C. Затем половину партии отваривали в течение 8 мин, далее охлаждали при комнатной температуре.

Сырые и вареные креветки измельчали на лабораторном миксере NHJJ (Tianjin Nithons Technology Co., Ltd., Китай). Измельченное сырье обезжиривали этиловым эфиром в соотношении 1 : 3 с последующим высушиванием.

Высушенные образцы (5 г) помещали в 200 мл раствора Эванса–Кока (0.08 М NaCl, 0.01 М Na₂HPO₄, 2 мМ KH₂PO₄, 4% фенола), pH 7.2.

Экстракцию проводили в течение 72 ч при 4°C. Для более полного извлечения гликопротеиновых комплексов из субстрата емкость с экстрагируемым материалом 3 раза в сутки с интервалом 1.5 ч помещали на 30 мин на аппарат для встряхивания жидкости (шейкер орбитальный лабораторный ПЭ-6500, Экросхим, Россия) при комнатной температуре (17–23°C). Затем экстракт центрифугировали на рефрижераторной центрифуге РС-6 (ОАО “ТНК “Дастан”, Киргизия) в течение 45 мин при 5000–6000 об/мин.

Для стерилизующей фильтрации использовали мембранные фильтры из политетрафторэтилена с диаметром пор 0.2 мкм (МФАС-Б, ЗАО НТЦ “Владипор”, Россия). После фильтрации в экстрактах определяли содержание белкового азота. Полученные объемы каждого аллергена составили

150 мл. Единицы белкового азота полученных экстрактов аллергенов определяли методом Несслера согласно ОФС.1.7.2.0026.15, количество белка – методом Бредфорд согласно ОФС.1.7.2.0034.15, величину pH – потенциометрическим методом согласно ОФС.1.7.2.0034.15.

Иммуноферментный анализ (ИФА). На первой стадии изучаемые образцы сорбировали в лунках цельного прозрачного 96-луночного планшета (высокое связывание, полистирол, Nest, Китай) по 100 мкл путем пассивной иммобилизации в концентрации 5 мкг/мл в 0.1 М карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ), pH 9.6. Планшеты выдерживали в течение 19–22 ч при 4°C, затем промывали 0.02 М фосфатным буфером (pH 7.2), содержащим 0.05% Tween 20 (ФСБ-Т). Образцы сывороток вносили в лунки в разведении 1 : 50, инкубировали в течение 1 ч, отмывали ФСБ-Т. Затем вносили по 100 мкл раствора меченных биотином антител к IgE человека, выдерживали 1 ч при 37°C и промывали ФСБ-Т. Далее добавляли по 100 мкл раствора конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена и выдерживали 1 ч при 37°C. После промывания в лунки вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора (pH 4.0) с 0.01%-ной перекисью водорода и 0.5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидином. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2 н. серной кислоты. Измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀) и длине волны сравнения 680 нм на приборе Multiskan Ascent (Thermo Labsystems, Финляндия).

Электрофорез в ПААГ. Электрофорез препаратов аллергенов сырых и вареных креветок проводили в 10%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE по Лэммли) согласно ОФС.1.2.1.0023.15 на приборе Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad, США).

Вестерн-блоттинг. После проведения электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью прибора Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, США). Мембраны блокировали 1%-ным раствором казеината натрия в фосфатно-солевом буфере (ФСБ-Т) и выдерживали с исследуемой сывороткой в разведении 1 : 100 в растворе 1%-ного БСА в ФСБ-Т в течение 1 ч при 37°C в шейкере-инкубаторе (New Brunswick, США) при скорости вращения 30 об/мин. После промывания ФСБ-Т мембрану инкубировали 1 ч при 37°C с раствором конъюгата антител против IgE с биотином, промывали и добавляли раствор конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена, выдерживали еще 1 ч при 37°C. Мембрану промывали ФСБ-Т и помещали в раствор цитратного буферного раствора (pH 4.0) с 0.01%-ной перекисью водорода и 0.5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (1-Step™ TMB-Blotting, Thermo Scientific, США). Результаты оценивали визуально.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были изучены аллергенные свойства белков водно-солевого экстракта тигровых креветок *P. monodon*. В результате ИФА с аллергоспецифичными сыворотками и электрофореза с последующим вестерн-блоттингом был оценен белковый профиль экстрактов креветок. На электрофореграмме визуально определено ~12 белков в составе экстракта из сырых креветок и 5 белков в экстракте вареных креветок. При этом только три белковые фракции из экстракта сырых креветок слабо связывали IgE больных, тропомиозин не был выявлен. В то же время пять белковых фракций в экстракте вареных креветок продемонстрировали высокоаффинное связывание. Вышеизложенное свидетельствует не только о сохранности аллергенных свойств белков креветок после термической обработки, но и об их высокой аллергенной активности. Выявленная аллергенная активность белковой фракции 55–60 кДа требует дальнейшего исследования, как и фракции 27–31 кДа. В состав последней фракции могут входить как денатурированные белковые фрагменты, образовавшиеся после термической обработки образцов и сохранившие аллергенную активность, так и один из аллергенов данных креветок – триозофосфатизомеразы [11].

Для упрощения диагностики поливалентной аллергии целесообразно получение очищенного паналлергена тропомиозина. Получение основного аллергена – тропомиозина в виде водно-солевого экстракта креветки *P. monodon* – позволит повысить эффективность диагностических тестов и методов изучения механизмов развития аллергии. В совокупности понимание перекрестной иммунологической реактивности имеет большое значение для расширения наших знаний об аллергии. Кроме того, эти знания могут помочь в разработке интеллектуальных инструментов для прогнозирования аллергенности новых белков или пищевых продуктов.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование “Разработка нативных и молекулярных форм аллергенов, предназначенных для диагностики и лечения аллергических заболеваний в педиатрической практике” выполнено в рамках темы № АААА-А19-119021890056-4 при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации с использованием оборудования Центра коллективного пользования ФГБНУ “НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не включала каких-либо исследований с участием пациентов. Исследования с колллекцией сывороток одобрены на заседании Этического

комитета ФГБНУ “НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (протокол № 2 от 19 февраля 2019 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Альбанова В.И., Петрова С.Ю.* // Атопический дерматит: учебное пособие для врачей. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. С. 50–83. <https://doi.org/10.33029/9704-6852-4-ATD-2022-1-168>
2. *Альбанова В.И., Пампура А.Н.* // Атопический дерматит, 2-е издание. Москва: ГЭОТАР-Медиа. 2020. С. 55–88. <https://doi.org/10.33029/9704-5640-8-АТП-2020-1-144>
3. *Лепешкова Т.С., Бельтюков Е.К., Наумова В.В., Смоленская О.Г., Царькова С.А., Савельева Е.В., Закирова Л.Р.* // Пищевая аллергия. Диагностика, лечение и профилактика: учебное пособие. Екатеринбург: УГМУ, 2021. С. 20–21.
4. *Гамбаров С.С., Кцюн Л.А.* // Трудный пациент. 2019. Т. 17. С. 47–50. <https://doi.org/10.24411/2074-1995-2019-10020>
5. *Грищенко Е.А.* // Аллергология и иммунология в педиатрии. 2017. Т. 48. С. 36–48. <https://doi.org/10.24411/2500-1175-2017-00006>
6. *Canonica G.W., Ansotegui I.J., Pawankar R., Schmid-Grendelmeier P., van Hage M., Baena-Cagnani C.E., Melioli G., Nunes C., Passalacqua G., Rosenwasser L., Sampson H., Sastre J., Bousquet J., Zuberbier T., Allen K., Asero R., Bohle B., Cox L., de Blay F., Ebisawa M., Maximiliano-Gomez R., Gonzalez-Diaz S., Haahnela T., Holgate S., Jakob T., Larche M., Matricardi P.M., Oppenheimer J., Poulsen L.K., Renz H.E., Rosario N., Rothenberg M., Sanchez-Borges M., Scala E., Valenta R.* // World Allergy Organ. J. 2020. V. 13. P. 100091. <https://doi.org/10.1016/j.wao-jou.2019.100091.13>
7. *Chafen J.J.S., Newberry S.J., Riedl M.A., Bravata D.M., Maglione M., Suttorp M.J., Sundaram V., Paige N.M., Towfigh A., Hulley B.J., Shekelle P.G.* // JAMA. 2010. V. 303. P. 1848–1856. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.582>
8. *Sicherer S.H.* // J. Allergy Clin. Immunol. 2011. V. 127. P. 594–602. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.044>
9. *Leung N.Y., Wai C.Y., Shu S., Wang J., Kenny T.P., Chu K.H., Leung P.S.* // Clin. Rev. Allergy Immunol. 2014. V. 46. P. 180–197. <https://doi.org/10.1007/s12016-012-8336-9>
10. *Insects as sustainable food ingredients: production, processing and food applications* / Ed. Dossey A.T., Morales-Ramos J.A., Rojas M.G. New York: Acad. Press, 2016. P. 252–272. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-03534-4>
11. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. <http://www.allergen.org>
12. *Piboonpocanun S., Jirapongsananuruk O., Tipayanon T., Boonchoo S., Goodman R.E.* // Mol. Nutr. Food Res. 2011. V. 55. P. 1492–1498. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000602>

13. Karnaneedi S., Huerlimann R., Johnston E.B., Nugraha R., Ruethers T., Taki A.C., Kamath S.D., Wade N.M., Jerry D.R., Lopata A.L. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. 32. <https://doi.org/10.3390/ijms22010032>
14. Бержец В.М., Петрова Н.С., Хлгатян С.В., Емельянова О.В. // Патент RU 2331437 C1, опубл. 20.08.2008. https://yandex.ru/patents/doc/RU2331437C1_20080820
15. Sahabudin S., Misnan R., Yadzir Z.H., Mohamad J., Abdullah N., Bakhtiar F., Murad S. // Malaysian J. Med. Sci. 2011. V. 18. P. 2732.
16. Faisal D., Vasiljevic T., Osaana D. // Int. J. Food Sci. Technol. 2019. V. 54. P. 183–193. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13922>
17. Liu G.-M., Cheng H., Nesbit J.B., Su W.-J., Gao M.-J., Maleki S.J. // J. Food. Sci. 2010. V. 75. P. 1–5.
18. Carnes J., Ferrer A., Huertas A.J., Andreu C., Larramendi C.H., Fernandez-Caldas E. // Ann. Allergy Asthma Immunol. 2007. V. 98. P. 349–354.
19. Kamath S.D., Rahman A.M., Voskamp A., Komoda T., Rolland J.M., O'Hehir R.E., Lopata A.L. // Mol. Nutr. Food Res. 2014. V. 58. P. 1144–1155. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300584>

Research of the Protein Profile and Allergenic Properties of the Tropomyosin and Other Allergenic Components in the Composition of Water-Salt Extract of Giant Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*)

V. M. Berzhets*, G. I. Alatortseva*, L. N. Nesterenko*, S. V. Khlgatian*, S. Yu. Petrova*, #, N. S. Petrova*, A. V. Vasilyeva*, L. A. Pishulina*, and O. Yu. Emelyanova*

*Phone: +7 (916) 463-32-97; e-mail: petrovastanislava@yandex.ru

*Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Maly Kazenny per. 5a, Moscow, 105064 Russia

Despite the success in identifying new crustacean allergens other than tropomyosin, many potential allergens remain unidentified. At present there are no diagnostic and treatment crustaceans allergens on the Russian market, including tropomyosin of invertebrates. The aim of the research was to explore allergenic properties of tropomyosin and other proteins in water-salt extract from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Raw and boiled meat of giant tiger shrimp was used to prepare allergenic extracts. To identify the specific activity of experimental allergens, sera from patients allergic to crustaceans with an established degree of activity (class 3) were used. The levels of specific IgE were from 3.5 to 17.5 IU/mL. ELISA was performed with the allergen samples. Polyacrylamide gel electrophoresis of raw and boiled shrimp allergen preparations was followed by Western blotting with the most allergen-specific serum. It has been shown that the extracts from raw and boiled shrimp have allergenic activity (bind IgE). The heat treatment of shrimp had no effect on allergenic activity except for one sample, where a strong reaction with the antigens was found. It is proved that the selected extraction conditions make it possible to reveal the multifractional nature of the protein profile of raw and boiled shrimp extracts. In Western blotting experiments the raw shrimp extract showed a weak reaction; tropomyosin was not detected. At the same time five protein fractions were identified in the boiled shrimp samples which reacted with IgE antibodies of a patient with crustaceans' allergy. The data obtained will allow us expanding the knowledge about crustacean allergy and continueing our research to determine the optimal conditions for cleaning shrimp allergens.

Keywords: tropomyosin, crustacean allergens, Penaeus monodon, pan-allergens, western blotting