آلرژی‌زاهای نوترکیب، ابزار نوین تشخیص بیماریهای آلرژیک

دکتر عبدالرضا وارسته[1]- دکتر مجید عارفی[2]

چکیده

حدود ۱۰ قرن پیش حکیم دانشمند ایرانی، زکریای رازی برای اولین بار، بیماری آلرژی را با ذکر علائم آن گزارش نمود؛ در آن زمان به دلیل وجود و شیوع بیماریهای عفونی در جوامع بشری که باعث مرگ و میرهای زیادی می‌شد، به این بیماری توجه خاصی نشد؛ ۱۰۰۰ سال پس از این گزارش، وضعیت بهداشتی جوامع بشری با کمرنگ شدن شیوع بیماریهای مسری تغییر یافت. در سالهای اخیر شاهد شیوع بیش از پیش بیماریهای آلرژیک هستیم که باعث تحمیل هزینه‌های سنگین به جامعه شده است؛ بنابراین تشخیص و درمان این دسته از بیماریها در ۲۰ سال گذشته، از جایگاه خاصی برخوردار شده است. علاوه بر گرفتن شرح حال، استفاده از آزمون پوستی توسط عصاره تام مواد آلرژی‌زا از قدیمی‌ترین روشهای تشخیص است. استفاده از عصاره تام که مشکلات متعددی در فرآیند تهیه و استانداردکردن آن وجود دارد، اغلب از حساسیت و ویژگی لازم جهت تشخیص بیماریهای آلرژی برخوردار می‌باشد. پیشرفتهای دهه‌های اخیر در زمینه روشهای بیوشیمیایی و فناوری بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک پروتئین‌ها، امکان شناسایی تهیه و تخلیص آلرژی‌زاهای طبیعی و نوترکیب را فراهم ساخته است. در این مقاله ضمن مروری کوتاه به روشهای تشخیص بیماریهای آلرژیک، جایگاه آلرژی‌زاهای نوترکیب، در ارتقای کیفی این روشها (حساسیت و ویژگی) مشخص شده است.

واژه‌های کلیدی: آلرژی‌زا؛ تشخیص آلرژی؛ آلرژی‌زای نوترکیب

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند (دوره ۱۳؛ شماره ۲؛ تابستان سال ۱۳۸۵)

دریافت: ۸۵/۵/۱۱ اصلاح نهایی:- پذیرش: ۸۵/۷/۲۰

[1] نویسنده مسؤول؛ دانشیار گروه ایمونولوژی مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

آدرس: مشهد- دانشگاه علوم پزشکی مشهد- مرکز تحقیقات ایمونولوژی

تلفن: ۰۵۱۱-۷۱۱۲۴۱۰ نمابر: ۰۵۱۱-۷۱۱۲۵۹۶ پست الکترونیکی: varastehmajid@hotmail.com

[2] محقق بخش ایمونوبیوشیمی مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

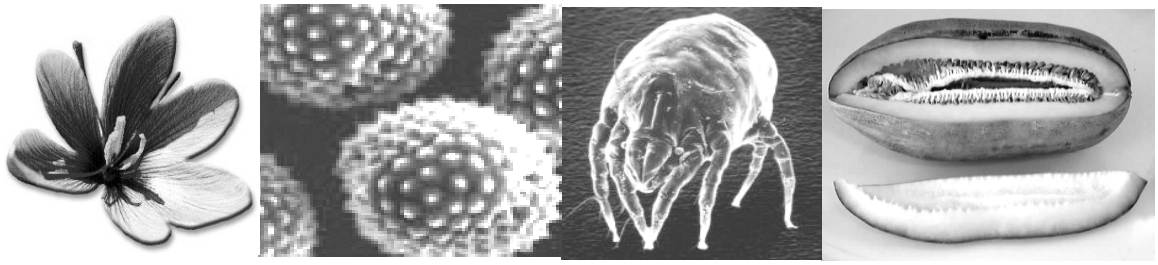
مقدمه

بیماریهای آلرژیک همه روزه باعث از کارافتادگی بسیاری از افراد و تحمیل هزینه‌های قابل توجهی به سیستم‌های بهداشتی- درمانی در کشورهای مختلف جهان می‌شوند. علائم آلرژی نوع یک (رینوکنژکتیویت آلرژیک، آسم و درماتیت آتوپیک) در اثر تولید آنتی‌بادی از کلاس IgE علیه آنتی‌ژن‌هایی (آلرژی‌زاها) که به خودی خود بی ضرر هستند، ایجاد می‌شود. واکنش ازدیاد حساسیت فوری مدتها قبل از کشف IgE توصیف شد (۱). شاید بتوان گفت که قدیمی‌ترین گزارش در این رابطه مربوط به حکیم عالیقدر ایرانی، زکریای رازی است که قبل از سال ۹۲۵ میلادی به شرح این بیماری پرداخت (۲). در قرن ۱۶ و ۱۷ میلادی هم بیمارانی با علائم زکام گل رز (Rose Catarrh) توصیف شدند. در قرن نوزدهم علائم این بیماری توسط جان بوستوک گزارش گردید. در سالهای اخیر ارتباط علائم این بیماری و پاسخ ایمنی وابسته به IgE مشخص گردیده است.

با توجه به مطالعات انجام شده در سالهای اخیر به نظر می‌رسد که شیوع آلرژی در جهان رو به افزایش است (۳). در برخی از کشورهای صنعتی جهان میزان این شیوع، تا ۴۰٪ تخمین زده شده است. آمار دقیقی از شیوع کلّی آلرژی در ایران در دست نیست. مطالعات منطقه‌ای انجام‌شده، نشان می‌دهد که شیوع آلرژی در کشور ما نیز می‌تواند بیش از ۲۰٪ باشد (۴-۶). دلیل افزایش شیوع آلرژی کاملاً مشخص نیست ولی می‌توان آن را با تغییراتی که طی دهه‌های گذشته در نوع و روش زندگی انسان به وجود آمده، مرتبط دانست. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و تغییر فلور باکتریایی روده، آلودگی محیط زیست، چاقی و کم‌تحرکی افراد، می‌تواند از جمله این تغییرات باشد. تأثیر عفونتها بر روی بروز آلرژی از موارد بحث‌انگیز است. با وجود این که عفونتها باعث وخیم‌تر شدن علائم آسم می‌شوند، عقیده بر این است که گسترش بهداشت عمومی و کنترل بیماریهای عفونی در دهه‌های گذشته باعث افزایش آتوپی شده است (۷). شواهدی در دست است که نشان می‌دهد رعایت اصول بهداشتی در کشورهای صنعتی، عفونتهایی را که باعث تغییر پاسخ ایمنی از TH2 (دخیل در آلرژی) به TH1 (فنوتیپ غیر دخیل در آلرژی) می‌شوند را کاهش می‌دهد (۸).

دلیل ایجاد بیماریهای آلرژیک برخورد یا تماس فرد آلرژیک (یا مستعد به آلرژی) با مواد آلرژی‌زا است. مواد آلرژی‌زا به موادی اطلاق می‌شود که پس از برخورد یا تماس با یک فرد آتوپیک، باعث ایجاد علائم بالینی آلرژی یا ازدیاد حساسیت نوع یک می‌شوند. این مواد آلرژی‌زا در گروههای مختلف مانند گرده گیاهان، مواد خوراکی، مواد آلرژی‌زای داخل خانه و مواد آلرژی‌زای شغلی تقسیم‌بندی می‌شوند (شکل۱).

در ساختار مواد آلرژی‌زا مولکول‌هایی وجود دارند که منشأ اصلی ایجاد آلرژی می‌باشند. این مولکول‌ها را که اغلب ماهیت پروتئینی دارند، آلرژی‌زا می‌نامند.



شکل ۱- مواد خوراکی، مایت‌ها و گرده گیاهان منابع مهم مواد آلرژی‌زا هستند.

تشخیص بیماریهای آلرژیک

تشخیص بیماری آلرژیک اغلب شامل دو مرحله اصلی می‌باشد. مرحله اول اثبات ارتباط بین علائم بالینی بیمار و پدیده آلرژی و در مرحله دوم، شناسایی ماده‌ای که باعث ایجاد علائم بالینی شده است (ماده آلرژی‌زا).

شایان ذکر است که در بسیاری از مواقع به سختی می‌توان این دو مرحله را از یکدیگر تفکیک نمود. هنگامی که بیمار به پزشک مراجعه می‌نماید، اولین مرحله تشخیص آلرژی، گرفتن شرح حال دقیق از بیمار می‌باشد. این شرح حال به پزشک کمک می‌کند که ضمن رد کردن احتمال وجود بیماریهای غیر آلرژیک، روشهای بعدی را جهت تشخیص بیماری آلرژیک و شناسایی ماده آلرژی‌زا انتخاب نماید. آزمایش‌های عمومی مانند IgE تام، میزان ائوزینوفیل‌ها و مقدار بعضی از سایتوکاین‌ها، می‌توانند تاییدکننده حضور بیماری آلرژیک باشند. این آزمایشها غیراختصاصی هستند و در بعضی از بیماریهای غیر آلرژیک نیز افزایش می‌یابند؛ بنابراین روشهای اختصاصی که با استفاده از مواد آلرژی‌زا قابل انجام می‌باشند، اساس تشخیص اختصاصی را تشکیل می‌دهند (جدول ۱). معمولاً با توجه به شرح حال و بررسی علائم بالینی، استفاده از روشهایی مانند آزمون پوستی، حذف یک ماده آلرژی‌زا از محیط زندگی (در صورت امکان)، بررسی IgE تام علیه ماده آلرژی‌زا و آزمون رهاسازی هیستامین از سلول‌های ماستوسیت بیمار می‌تواند در تشخیص بیماری آلرژیک و شناسایی ماده آلرژی‌زا مفید واقع گردد.

روشهای رایج و اختصاصی تشخیص بیماریهای آلرژیک که در جدول ۱ ارائه شده است، با استفاده از مواد آلرژی‌زا قابل انجام است؛ بدیهی است شروع تشخیص بیمارهای آلرژیک با گرفتن شرح حال دقیق از بیمار شروع می‌شود که در این جدول لحاظ نشده است.

آزمون پوستی

آزمون پوستی و آزمونهای زیر جلدی و داخل پوستی به آسانی قابل انجام هستند؛ این آزمونها در صورت وجود حساسیت، تقریباً ظرف ۱۰–۱۵ دقیقه آن را نشان می‌دهد. اساس کار این آزمون، وارد کردن مقدار کمی آلرژی‌زا به داخل اپیدرم است. اگر IgE اختصاصی در سطح ماستوسیت‌ها وجود داشته باشد، مولکول‌های آلرژی‌زا به این IgEها متصل می‌شوند. بین ۵۰۰۰–۱۲۰۰۰ ماستوسیت در هر میلیمتر مکعب در جوار عروق خونی و اعصاب برای ایجاد واکنش آلرژیک کافی می‌باشد. اتصال مولکول آلرژی‌زا به IgE علامتی را به سلول ماستوسیت ارسال می‌دارد که باعث آزاد شدن هیستامین و تولید واسطه‌های شیمیایی دیگر می‌شوند. واسطه‌های شیمیایی باعث اتصاع عروق و پرخونی و ادم بافتی می‌شوند که در نهایت به صورت کهیر مشاهده می‌شود. هیستامین باعث آزاد شدن نوروميدياتور P از اکسون‌ها و منجر به قرمزی اطراف کهیر می‌گردد (۹).

واکنش پوستی معمولاً ظرف ۵ دقیقه و پس از تزریق آلرژی‌زا آغاز می‌شود و به دنبال آن یک مرحله تاخیری وجود دارد که ۱–۲ ساعت بعد شروع می‌شود و ظرف ۶– ۸ ساعت به حداکثر خود می‌رسد و ظرف ۲۴–۴۸ ساعت بهبود می‌یابد (۹).

جدول ۱– روشهای رایج و اختصاصی تشخیص بیماریهای آلرژیک

نوع آزمون	In vivo		In vitro	
	پوستی	مقابله‌ای	IgE اختصاصی	رهاسازی هیستامین
مزایا	سریع، ارزان، عدم نیاز به امکانات خاص	اختصاصی جهت عضو خاص، روش تائیدی	عدم تداخل دارویی، بی خطر، عدم تداخل با بیماریهای پوستی،	اختصاصی، روش تائیدی
معایب	تداخل دارویی، تا حدودی تهاجمی	تهاجمی، قابل انجام در شرایط خاص	نیاز به پاراکلینیک	تداخل دارویی، نیاز به پاراکلینیک

میزان هیستامین آزادشده در واکنش ازدیاد حساسیت فوری به وسیله روش میکرودیالیز پوست مورد مطالعه قرار گرفته است. حداکثر غلظت هیستامین ۴-۸ دقیقه بعد از تزریق داخل جلدی و کمی بیشتر از این زمان در مورد آزمون پوستی، اندازه‌گیری شده است. واسطه‌های شیمیایی متعددی در مرحله تاخیری واکنش ازدیاد حساسیت فوری، شناخته شده‌اند که از جمله می‌توان به هیستامین، کالیکرین، ترمبوکسان، پرستوگلاندین D_2 و لوکوترین C_4 اشاره کرد.

روشهای مقابله‌ای

آزمونهای پوستی و سرمی نشان‌دهنده IgE اختصاصی علیه آلرژی‌زا هستند ولی برخی از آلرژی‌ها (آلرژی غذایی) را بخوبی تشخیص نمی‌دهند؛ بنابراین روشهای تشخیصی دیگری نظیر آزمون تحریک دهانی یا رژیم‌های تشخیصی برای تایید یا رد این آلرژی‌ها باید به کار گرفته شود.؛ اگر چه روشهای متعددی برای آزمون تحریک دهانی وجود دارد ولی در حال حاضر آزمون مقابله‌ای دوسوکور با ماده غذایی و کنترل (DBPCFC) به عنوان استاندارد طلایی تشخیص آلرژی‌های غذایی شناخته شده است. در این آزمون، در شرایطی به بیمار غذا خورانده شود که بیمار از ماسک‌های خاص استفاده می‌کند تا نتواند طعم، بو و جنس ماده خوراکی را تشخیص دهد.

استفاده از آزمونهای In-vitro

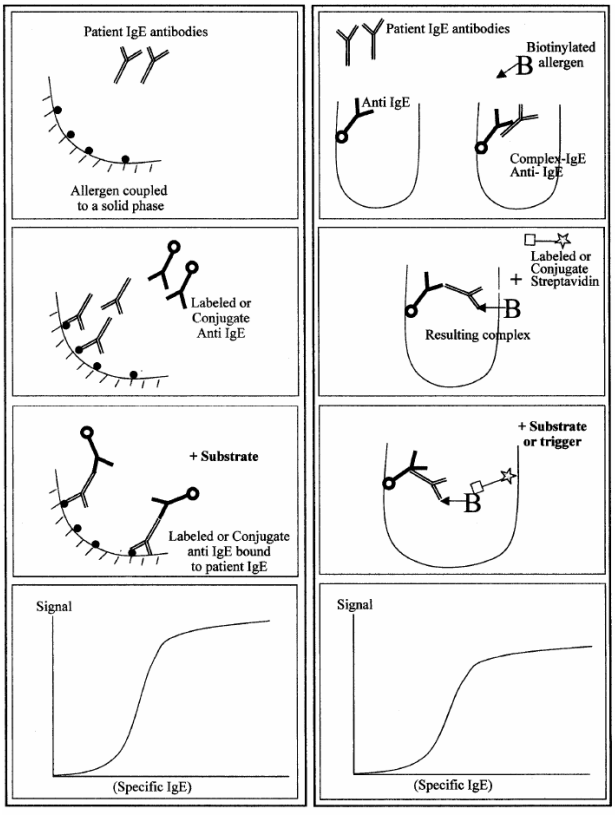
آزمونهای In-vitro جهت تعیین IgE اختصاصی به منظور تشخیص و یا تایید تشخیص آلرژی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۱،۱۰).

مزیتهای مختلفی برای تشخیص آلرژی از طریق روشهای In-vitro وجود دارد؛ از جمله امکان ارزیابی کمّی پاسخ ایمنی و عدم تداخل دارویی و در مورد آزمونهای سرمی، امکان نگهداری طولانی‌مدت نمونه را می‌توان ذکر کرد.

از جمله آزمونهای in-vitro می‌توان به RAST* و یا EAST† اشاره نمود. اساس کار آزمونهای اندازه‌گیری IgE بر اتصال کمپلکس آلرژی‌زا–IgE به آنتی IgE نشاندار می‌باشد (شکل۲). در شکل ۲، روشهای معمول برای اندازه گیری IgE اختصاصی سرم بیمار به تصویر کشیده شده است (۷). در روش A، اندازه گیری IgE اختصاصی بر اساس پیوند IgE به آلرژی‌زای متصل شده به سطح جامد انجام می‌شود. در روش B، اندازه‌گیری IgE اختصاصی بر اساس اتصال IgE به آلرژی‌زاهای محلول نشاندار صورت می‌پذیرد.

محدودیتهای تشخیص استفاده از عصاره‌های مواد آلرژی‌زا

امروزه انجام آزمون پوستی جهت تشخیص بیماریهای آلرژیک توسط عصاره تام یک ماده آلرژی‌زا انجام می‌شود.



شکل ۲- روشهای معمول برای اندازه گیری IgE اختصاصی سرم بیمار

* Radio Allegro Sorbant Test
† Enzym Labeled Allergo Sorbant Test

ساختار مواد آلرژی‌زا معمولاً پیچیده است و علاوه بر مولکول‌های آلرژی‌زا (در غلظتهای مختلف) شامل بسیاری از پروتئین‌های غیر آلرژی‌زا (۱۲)، کربوهیدرات‌ها و مواد با وزن مولکولی کم مثل هیستامین و یا ترکیبات سرکوب‌کننده ایمنی می‌باشند (۱۳). کیفیت عصاره‌های طبیعی تحت تأثیر عوامل متعددی نظیر کیفیت مواد خام اولیه (۱۴)، محل تولید مواد خام اولیه و شرایط محیطی، چگونگی روش تهیه عصاره (۱۵) و شرایط نگهداری قرار می‌گیرد (۱۶). این عوامل تأثیر بسیاری روی ترکیب نهایی، کیفیت و پایداری عصاره ماده آلرژی‌زا دارند. بیشتر عصاره‌هایی که از منابع طبیعی تهیه می‌شوند، از نظر ترکیب و تنوع آلرژی‌زاها و مقدار آنها متفاوت هستند و نتایج متفاوتی را در آزمونهای اندازه‌گیری IgE و آزمون پوستی نشان می‌دهند (۱۷)؛ بنابراین استانداردکردن عصاره‌های مواد آلرژی‌زا ضروری به نظر می‌رسد تا این که آزمونهای مختلف برای تشخیص آلرژی، از حساسیت و ویژگی یکسانی برخوردار باشند. امروزه عصاره‌ها عمدتاً بر اساس آلرژی‌زاهای اصلی استاندارد می‌شوند. آلرژی‌زاهای اصلی مولکول‌هایی هستند که با سرم بیش از نیمی از افراد حساس به یک ماده آلرژی‌زا واکنش نشان می‌دهند؛ بنابراین این نوع عصاره‌ها در مورد فردی که به آلرژی‌زای فرعی حساس می‌باشد، استاندارد نیست. کیفیت عصاره علاوه بر چگونگی روش تولید عصاره، به نوع مواد خام هم بستگی دارد؛ برای مثال عصاره‌هایی که از تمامی بدن زنبور و یا فقط از سمّ زنبور تهیه می‌شوند، بسیار متفاوت هستند؛ این تفاوت همچنین در مواردی که عصاره قارچ از کشتهای جدید یا قدیمی تهیه می‌شود و یا موارد دیگر به چشم می‌خورد (۱۸).

علاوه بر موارد فوق، امکان آلودگی عصاره‌های طبیعی به آلرژی‌زاهایی از سایر منابع نیز وجود دارد. کیفیت عصاره‌ها طی روند تهیه عصاره‌ها ممکن است تحت تأثیر پروتئازها تغییر کند. آنزیم‌های پروتئولیتیک ممکن است جزو آلرژی‌زای عصاره باشند یا نباشند، ولی به هر حال باعث تخریب پروتئین‌های عصاره می‌شوند و کیفیت عصاره را جهت مقاصد تشخیصی و یا درمانی کاهش می‌دهند. تفاوت عصاره‌های مواد آلرژی‌زا در هر سری تولید، یکی از مشکلات اصلی در تکرارپذیری روشهای تشخیص آلرژی می‌باشد. این مطلب امکان مقایسه مستقیم نتایج مطالعات مختلف را مشکل می‌سازد.

در دهه گذشته با توجه به پیشرفتهایی که در علم بیوشیمی و شیمی پروتئین‌ها به وجود آمده، استاندارد کردن عصاره‌های طبیعی پیشرفت چشمگیری داشته است. برای بسیاری از آلرژی‌زاهای تنفسی روشهای استاندارد بیولوژیکی (بر اساس آزمون جلدی بر روی افراد حساس) مشخص شده‌اند. امروزه عصاره‌های استانداردی که توسط FDA تائید شده‌اند، وجود دارند. از این میان می‌توان به عصاره موی گربه، پوست گربه، درماتوفاگوئید فارینا و بیشتر سم‌های هایمنوپترا اشاره کرد. تعداد قابل توجهی از عصاره‌های استاندارد از گرده گیاهان هم به صورت تجاری در دسترس می‌باشد. برای بیشتر آلرژی‌زاهای حاصل از مواد آلرژی‌زای پیچیده مثل قارچ‌ها، کپک‌ها، مخمرها، غذاها و برخی گرده‌ها هنوز عصاره‌های استانداردی که از نظر بین المللی قابل قبول باشد، موجود نیست. این مواد آلرژی‌زا حاوی ترکیبات پیچیده‌ای از مولکول‌های آلرژی‌زای مختلف بین ۲۰ تا ۸۰ مولکول آلرژی‌زا در هر ترکیب می‌باشند. حساسیت و ویژگی عصاره‌هایی که از تولیدکنندگان مختلف خریداری می‌شوند، بسیار متفاوت هستند (۱۸)؛ بنابر آنچه اشاره شد عصاره‌های طبیعی جهت تشخیص آلرژی ایده‌آل نیستند؛ از این رو محققین در سالهای اخیر به سمت شناسایی و استفاده از مولکول‌های آلرژی‌زا جهت تشخیص آلرژی گام برمی‌دارند.

مولکول‌های آلرژی‌زا

با توجه به مشکلات مطرح شده، محققین در سالهای اخیر تحقیقات متعددی در جهت پایه‌ریزی روشهای تشخیص آلرژی بر مبنای مولکول‌های آلرژی‌زا به جای عصاره مواد آلرژی‌زا انجام داده‌اند. برای تحقق این هدف مولکول‌های

آلرژی‌زای موجود در مواد آلرژی‌زای مختلف می‌بایست شناسایی شوند. تا خرداد سال ۱۳۸۵، ۵۱۲ ماده آلرژی‌زا در مواد آلرژی‌زای مختلف گزارش شده است (جدول ۲).

همانگونه که در جدول ۳ نشان داده شده است پروتئین‌های آلرژی‌زا دارای اعمال متابولیکی متفاوت هستند و در گروههای مختلف پروتئین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند.

برای ایجاد نظم در طبقه‌بندی و نام‌گذاری آلرژی‌زاها، پایگاه اینترنتی www.allergen.org ایجاد شده است. محققین موارد جدید آلرژی‌زاها را به این پایگاه گزارش می‌کنند؛ پس از بررسی در کمیته مربوط در صورت تصویب، در پایگاه ثبت می‌گردد. نحوه نام‌گذاری جهانی آلرژی‌زاها با استفاده از سه حرف جنس، با یک حرف اول گونه (با نام لاتین) همراه با یک عدد بعد از حرف گونه می‌باشد. معمولاً این عدد نشان‌دهنده تقویم زمانی کشف آلرژی‌زا در ماده آلرژی‌زای خاص می‌باشد. گاهی نیز این عدد نشان‌دهنده گروه‌بندی آلرژی‌زاها در میان مواد آلرژی‌زای مختلف می‌باشد؛ برای مثال آزمایشگاه ایمونوبیوشیمی مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد موفق به ثبت ۳ آلرژی‌زای جدید در پایگاه فوق شده است (۱۹).

یکی از این آلرژی‌زاها مربوط به آلرژی‌زای اصلی، گرده گیاه زعفران است که با نام Cro s 1 (*Crocus Sativus*) (۲۰-۲۲) و دیگری، مربوط به میوه خربزه مشهد می‌باشد که با نام Cuc m 2 (*Cucumis Melo*) ثبت شده است. این آلرژی‌زا که باعث ایجاد علائم آلرژیک در افراد بعد از خوردن خربزه مشهد می‌شود، بیشتر در ماده ژله‌ای زرد رنگ موجود در سطح داخلی میوه خربزه وجود دارد.

پس از شناسایی آلرژی‌زاهای مواد آلرژی‌زا، روشهای اختصاصی (Specific IgE) جهت تعیین نوع آلرژی‌زای درگیر در بیماری و تشخیص بیماریهای آلرژیک راه‌اندازی شد (۲۴،۲۳)؛ اما خیلی زود محققین دریافتند که تخلیص و استاندارد کردن آلرژی‌زاهای طبیعی در مقیاس انبوه جهت تشخیص، کار سخت و دشواری می‌باشد. پیشرفتهای شگفت‌انگیز در روشهای بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک در دهه‌های گذشته امکان ایجاد پروتئین‌های نوترکیب را با میزان و کیفیت مرغوب فراهم نمود؛ بنابراین تحقیقات متعددی جهت تولید آلرژی‌زاهای نوترکیب آغاز گردید.

بسیاری از آلرژی‌زاها از گرده‌ها، مایت‌ها، حیوانات خانگی، کپک‌ها، قارچ‌ها، نیش حشرات و غذاها شناسایی و DNA مربوطه کلون شده و به صورت نوترکیب تولید گردیده‌اند. آلرژی‌زاهای نوترکیب در سیستم‌های مختلف بیان ژن، مثل باکتری و مخمر تولید می‌شوند و خواص ایمونو بیوشیمیایی اغلب این آلرژی‌زاها قابل مقایسه با نوع طبیعی آنها می‌باشد (۱۸).

بر خلاف آلرژی‌زاهای طبیعی موجود در عصاره‌های مواد آلرژی‌زا، آلرژی‌زاهای نوترکیب را می‌توان با سهولت و با خلوص بالا تهیه نمود. آلرژی‌زاهای نوترکیب در سری‌های مختلف تولید، کیفیت یکسانی دارند؛ در حالی که مقدار آلرژی‌زاهای مختلف موجود در عصاره‌های طبیعی در سری‌های متعدد تولید متفاوت است.

با توجه به مشکلات مربوط به آلودگی عصاره‌های طبیعی نسبت به سایر منابع آلرژی‌زا و تغییر آلرژی‌زایی در طی روند تهیه عصاره و گوناگونی در ترکیبات آلرژی‌زاهای عصاره‌ها، استفاده از آلرژی‌زاهای نوترکیب برای حل این مشکلات مناسب به نظر می‌رسد.

از آنجا که آلرژی‌زاهای نوترکیب به طور کاملاً خالص و یکسان تهیه می‌شوند، از این آلرژی‌زاها می‌توان برای مقایسه روشهای مختلف تشخیصی In- vivo و In- vitro استفاده کرد.

جدول۲- آلرژی‌زاهای مواد مختلف آلرژی‌زای شناسایی و ثبت شده تا خرداد ۱۳۸۵ در سایت allergen.org

ماده آلرژی‌زا	گرده گیاهان	مایت‌ها	حیوانات	قارچ‌ها	حشرات	خوراکیها	سایر
تعداد آلرژی‌زای شناخته شده	۱۰۷	۴۷	۲۷	۹۱	۷۸	۱۳۱	۳۱

آلرژی‌زاهای نوترکیب ابزار ارزشمندی برای مطالعه فرایند دخیل در واکنش‌های آلرژیک و مطالعه ارتباط ساختمان و عملکرد مولکول‌های آلرژی‌زا هستند (۱۸).

ارتباط اپی‌توپ‌های سلول‌های B یا T در آلرژی‌زاهایی که از نظر ساختاری به هم شبیه می‌باشند، در مواد مختلف آلرژی‌زا مشخص شده است؛ این پدیده می‌تواند توضیحی برای حساسیت افراد به چند مولکول آلرژی‌زا در مواد آلرژی‌زای مختلف باشد.

شواهد نشان می‌دهند که شناسایی پروتئین‌های آلرژی‌زا توسط آنتی‌بادی IgE تا حدود زیادی به ساختار سه‌بعدی این پروتئین‌ها بستگی دارد. آلرژنیسیته پروتئین‌ها با ساختمان اول پروتئین‌ها، ارتباط مستقیم دارد؛ اما ساختمان سه بعدی آلرژی‌زاها به وسیله فناوری NMR، کریستالوگرافی با اشعه X و یا مدل‌سازی رایانه‌ای شواهد مهمّی در مورد اهمیت شکل فضایی پروتئین‌ها در اتصال به IgE در اختیار قرار داده است (۱۸).

فعالیتهای بیولوژیک بسیاری از آلرژی‌زاهایی که تاکنون شناسایی شده‌اند، مشخص شده است. تعداد قابل توجهی از این پروتئین‌ها به صورت معمول در مواد آلرژی‌زا موجود می‌باشند و در فیزیولوژی سلولی آنها نقش ایفا می‌کنند. این پروتئین‌ها دارای فعالیتهای فیزیولوژیکی متعددی (از آنزیمی تا ساختاری) می‌باشند. در جدول ۳ تعدادی از این آلرژی‌زاها و نوع فعالیت بیولوژیک آنها مشخص شده است (۲۵).

جدول ۳- تعدادی از پروتئین‌های آلرژی‌زا که به خانواده‌های مختلف با اعمال متابولیکی متفاوت تعلق دارند.

خانواده پروتئین آلرژی‌زا	مثال
خانواده بزرگ کوپین	
ویسیلین	Ara h 1 (بادام زمینی)
لگومین	Ara h 3,4 (بادام زمینی)
خانواده بزرگ پرولامین	
آلبومین	Ber e 1 (بادام هندی) و Ses I 2 (کنجد)
(nsLTPs) non specific lipid transfer proteins	Pru p 3 (هلو) و Cor a 8 (فندق)
مهارکننده‌های α-amylas و پروتئاز	مهارکننده‌های α-amylas (برنج)
پرولامین غلات	Tri a 19 (گندم)
پروتئین‌های سیستم دفاعی گیاهان	
Pathogenesis-related proteins	Banana glucanase , Pers a 1 (آوکادو)
پروتئازها	Act c 1 (کیوی) و Cuc m 1 (خربزه)
مهارکننده‌های پروتئازها	Soybean trypsin inhibitor
پروتئین‌های با ویژگی آنزیمی	
Phenylcoumaran benzyilic ether reductase	Pyr c 5 (گلابی)
Cyclophilins	سیکلوفیلین‌های هویج
ß-fructofuranosidases	Lyc e 2 (گوجه فرنگی)
Flavin adenine dinucleotid-dependent oxidases	Api g 5 (کرفس)
پروتئین‌های ساختاری	
پروفیلین	Api g 4 (کرفس) و Pru a 1 (گیلاس)
اولئوزین	اولئوزین بادام زمینی

منشأ واکنش متقاطع و تأثیر آن در تشخیص بیماریهای آلرژیک

به طور معمول مواد آلرژی‌زا دارای ساختار پیچیده مولکولی می‌باشند. از میان ده‌ها هزار مولکول موجود در این مواد ممکن است یک یا چند مولکول، آلرژی‌زا محسوب شوند. برخی از این مولکول‌های آلرژی‌زا با ساختارهای مشابه یا کمی متفاوت به صورت مشترک در چندین ماده آلرژی‌زا موجود می‌باشند. اگر افراد آلرژیک، به یکی از این مولکول‌ها حساس شده باشند، پس از تماس با هر یک از این مواد (حتی برای اولین بار) ممکن است علائم بالینی آلرژی را بروز دهند. این پاسخ مشابه به چندین ماده آلرژی‌زا به علت حضور مولکول‌های مشابه در آنها را واکنش متقاطع می‌نامند. همان‌طور که در شکل ۳، مشخص شده است، چنانچه تشخیص اختصاصی به صورت In-vivo یا In-vitro انجام شود، و فردی دارای واکنش مثبت نسبت‌به مولکول باشد می‌توان پیش‌بینی نمود که این فرد به میوه خربزه و یا هر ماده آلرژی‌زایی که دارای مولکول مشابه فوق باشد، حساسیت نشان می‌دهد. بعضی از مولکول‌های آلرژی‌زا در بین بسیاری از مواد آلرژی‌زا مشترک است؛ به عنوان مثال مولکول پروفیلین که به عنوان یک مولکول آلرژی‌زا شناخته شده است، در بسیاری از مواد آلرژی‌زا نظیر گرده گیاهان، میوه‌جات، سبزیجات و آجیل وجود دارد. از طرفی بعضی از مولکول‌های آلرژی‌زا فقط در گروه محدودی از مواد آلرژی‌زا یافت می‌شوند. از این مولکول‌ها می‌توان به عنوان نشانگر آلرژی‌زا جهت تشخیص و درمان اختصاصی آلرژی استفاده نمود (۲۶)؛ البته پدیده‌های واکنش متقاطع می‌توانند دارای ماهیت بسیار پیچیده‌ای باشند. بر روی یک مولکول آلرژی‌زا چند اپی‌توپ وجود دارد. گاهی ممکن است مولکول‌های آلرژی‌زای مشابه موجود در چندین ماده آلرژی‌زا علاوه بر داشتن اپی‌توپ‌های مشترک دارای اپی‌توپ‌های اختصاصی نیز باشند؛ در این موارد در صورتی واکنش متقاطع بروز می‌کند که یک فرد به اپی‌توپ‌های مشترک مولکول‌های آلرژی‌زا حساس شده باشد اما در صورتی که واکنش فرد حساس، به یک اپی توپ اختصاصی از مولکول آلرژی‌زا باشد، واکنش متقاطع بروز پیدا نمی‌کند (شکل ۴).

مولکول‌های یکسان در مواد آلرژی‌زا می‌توانند منشأ واکنش متقاطع باشند. شکل ۳، مولکول‌های آلرژی‌زا را در دو ماده آلرژی‌زای خربزه و انگور نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود مولکول آلرژی‌زای شماره ۲ از میوه انگور، دارای شکل فضایی مشابه با مولکول آلرژی‌زا ۴ در میوه خربزه می‌باشد؛ بنابراین فقط در صورتی بین این دو میوه واکنش متقاطع در یک فرد ایجاد خواهد شد که فرد به مولکول ۲ از میوه انگور یا مولکول ۴ از میوه خربزه حساس شده باشد.

خربزه	انگور
۱	۱
۲	۲
۳	۳
۴	۴

شکل ۳- پدیده واکنش متقاطع در سطح مولکولی

شکل ٤- نمایی از مولکول پروفیلین موجود در هندوانه و خربزه

در شکل ۴، اپی‌توپ‌های اختصاصی پروفیلین خربزه به رنگ مشکی، اپی‌توپ‌های اختصاصی پروفیلین هندوانه به رنگ سفید و اپی‌توپ‌های مشترک این دو مولکول با رنگ خاکستری مشخص شده‌اند؛ بنابراین فقط در صورتی واکنش متقاطع بین دو مولکول ایجاد خواهد شد که یک فرد به اپی‌توپ مشترک حساس شده باشد. در تصویر فوق، اشکال هندسی (دایره، مثلث و ...) که در اطراف بیضی قرار گرفته‌اند، اپی‌توپ‌های دو مولکول را نشان میدهند.

در برخی از موارد ایجاد واکنش متقاطع به دلیل حضور اپی‌توپ‌های مشابه صورت می‌پذیرد. شکل ۴، مثالی از واکنش متقاطع (در سطح اپی‌توپ) برای دو مولکول آلرژی‌زا پروفیلین از میوه‌های خربزه و هندوانه می‌باشد. این دو مولکول در زنجیره خطی ساختمان اول خود دارای ۹۲٪ هومولوژی هستند و همان‌طور که نشان داده شده این دو مولکول از نظر ساختمان سوم پروتئینی بسیار شباهت دارند و در برخی قسمتها متفاوتند. حال اگر سیستم ایمنی علیه این قسمتهای متفاوت تحریک شده باشد، واکنش متقاطع بین این دو میوه وجود ندارد. شایان ذکر است که به طور خاص در مورد مثال فوق، ساختمان سوم مولکول پروفیلین در میوه خربزه و هندوانه به صورتی است که بیشتر توالی قسمتهای متفاوت در سطح مولکول قرار می‌گیرند؛ بنابراین واکنش متقاطع در این دو میوه کمتر مشاهده می‌شود (۲۷).

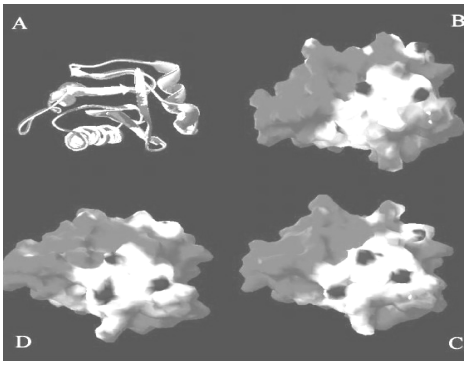
در شکل ۵، ساختمان سه‌بعدی مولکول پروفیلین موجود در چند آلرژی‌زا مقایسه شده است؛ A ساختار سه‌بعدی مولکول پروفیلین و B، C و D مقایسه ساختمان سه بعدی مولکول پروفیلین خربزه، هندوانه و گوجه فرنگی نشان می‌دهد. بیشتر قسمتهای مشترک سه مولکول B، C و D در قسمتهای داخلی و قسمتهای متفاوت در سطوح قابل دسترس قرار دارند (۲۷).

هرگاه بیماری به دلیل وجود واکنش متقاطع، هنگام آزمون نسبت به عصاره‌های تام چند ماده آلرژی‌زای مختلف واکنش مثبت نشان دهد، این سوال مطرح می‌شود که ایمونوتراپی با کدام ماده آلرژی‌زا شروع شود. در این خصوص، استفاده از آلرژی‌زاهای نوترکیب برای حل مشکل، در تشخیص و درمان بیماریهای آلرژیک منطقی به نظر می‌رسد.

تولید آلرژی‌زاهای نوترکیب

در ۲۵ سال اخیر پیشرفتهای چشمگیری در بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک پروتئین‌ها صورت پذیرفته است؛ در این میان علم آلرژی نیز از آن بی بهره نبوده است. در حال حاضر بسیاری از آلرژی‌زاهای اصلی و فرعی کلون و به صورت نوترکیب تولید شده‌اند (۲۸-۳۰). اغلب این آلرژی‌زاها در خواص بیوشیمیایی و توانایی تحریک پاسخ ایمنی با نوع طبیعی خود مشابه می‌باشند. تولید این پروتئین‌ها در میزبانهای مختلف (باکتری، مخمر، گیاهان) انجام شده است. این پروتئین‌های نوترکیب خالص شده، امکان تعیین ساختمان بعضی از آلرژی‌زاها را توسط روشهای کریستالوگرافی و NMR فراهم نموده است. استفاده از داده‌های کریستالوگرافی این مولکول‌ها و نرم‌افزارهای مدل‌سازی، امکان پیشگویی ساختمان بسیاری از آلرژی‌زاهای دیگر را فراهم ساخته است.

تاکنون توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی صدها آلرژی‌زا مشخص شده است. از این میان سه آلرژی‌زا از بخش ایمونوبیوشیمی مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد گزارش شده است. برای درک بهتر چگونگی شناسایی و تولید یک آلرژی‌زای جدید مثال آلرژی‌زای خربزه، به صورت خلاصه توضیح داده می‌شود (۳۱).

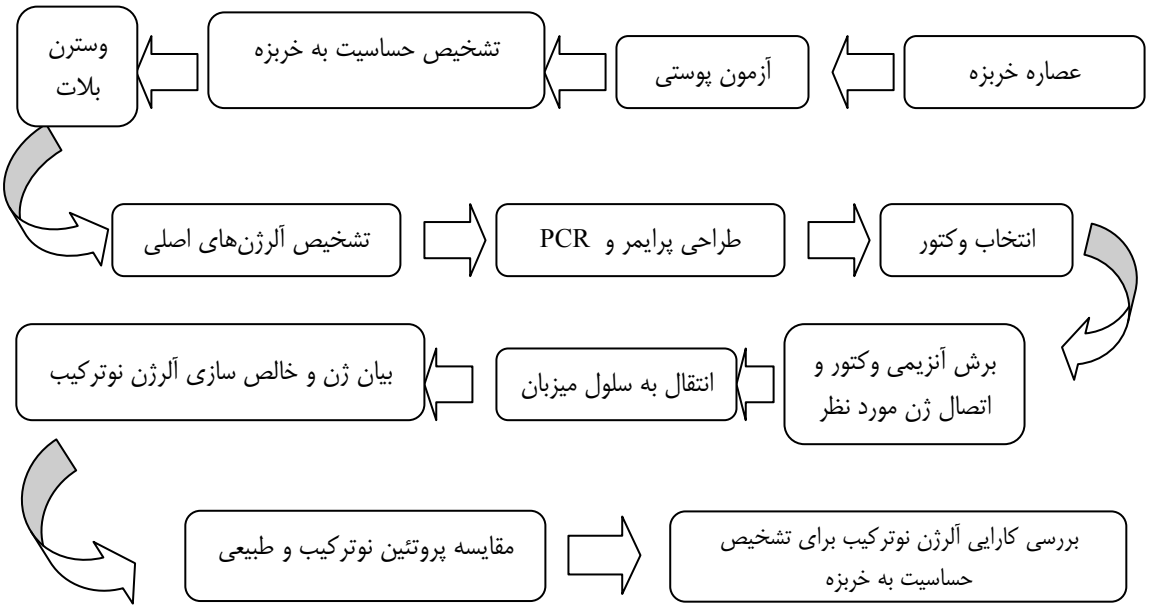


شکل ۵- مقایسه ساختمان سه بعدی مولکول پروفیلین موجود در چند آلرژی‌زا

بیماران حساس به خربزه بر اساس علائم بالینی و آزمون پوستی گزینش شدند. آلرژی آنها به خربزه توسط روش الایزای IgE اختصاص (IgE-Specific ELISA) تایید شد. در آزمون وسترن بلات با استفاده از سرم بیماران و عصاره تام خربزه، یک پروتئین در محدوده ۱۴ کیلودالتون دارای بیشترین واکنش با سرم بیماران بود. پ

س از تخلیص پروتئین مذکور، مشاهده شد که این پروتئین توانایی اتصال به PLP (Poly L Prolin) را دارد. با توجه به وجود این ویژگی و محدوده وزن مولکولی آن حدس زده شد که این پروتئین احتمالاً متعلق به خانواده پروفیلین‌ها می‌باشد. با استفاده از پرایمرهای دژنره و روش PCR موفق به دستیابی به توالی قسمتی از ژن پروتئین مورد نظر شدیم. پس از تعیین توالی قطعه نوکلئوتیدی فوق و استفاده از روش RACE توالی کامل ژن آلرژی‌زای مورد نظر مشخص شد. در مرحله بعد با استفاده از توالی‌های بدست آمده، به منظور کلونینگ cDNA آلرژی‌زا در وکتور بیان‌کننده، پرایمرهای اختصاصی طراحی شد. توسط روش PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی و cDNA تام میوه خربزه، ناحیه کدکننده مولکول آلرژی‌زا تکثیر گردید. از پلاسمید pET21b+ به عنوان وکتور بیان‌کننده استفاده شد. در مرحله بعد، وکتور بیان‌کننده و محصول PCR با آنزیم‌های محدودالاثر، به طور جداگانه برش زده شدند؛ سپس محصول PCR توسط آنزیم لیگاز به داخل پلاسمید متصل شد. پلاسمید نوترکیب ایجاد شده وارد باکتر DH5-α گردید. پس از اثبات وجود قطعه مورد نظر، پلاسمید نوترکیب به منظور بیان پروتئین وارد باکتری BL21-DE3 گردید.

پس از بهینه‌سازی شرایط بیان پروتئین، تولید آن در مقیاس آزمایشگاهی انجام گردید. سپس پروتئین بیان شده با استفاده از ستون متال افینتی کروماتوگرافی (NTA-Ni) خالص گردید. در نهایت آلرژنیسته پروتئین نوترکیب به روش IgE Specific ELISA، ایمونوبلات و آزمون پوستی تایید شد. واکنش متقاطع آن با سایر مواد آلرژی‌زا به روش ELISA Inhibition مورد بررسی قرار گرفت (شکل۶).



شکل ٦- خلاصه‌ای از مراحل مختلف شناسایی، کلونینگ، تولید و تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی مولکول آلرژی‌زا خربزه (۳۱)

معیارهای تولید آلرژی‌زاهای نوترکیب

تشخیص و درمان آلرژی براساس جزء آلرژی‌زا می‌تواند جایگزین مناسبی برای تشخیص بر مبنای عصاره تام باشد. تا به امروز آلرژی‌زاهای نوترکیب بسیاری با استفاده از مهندسی ژنتیک ساخته شده است. در تولید آلرژی‌زاهای نوترکیب معیارهای مختلفی باید مورد نظر قرارگیرند که در ذیل اشاره مختصری به هر یک از آنها شده است.

انتخاب سیستم بیان ژن و ایجاد DNA نوترکیب

برای تولید پروتئین آلرژی‌زای نوترکیب باید میزبان مناسبی برای بیان ژن انتخاب شود. دانسته‌های ما در مورد وضعیت گلیکوزیلاسیون، وجود باندهای دی سولفیدی داخل زنجیره‌ای، اسیدهای آمینه N ترمینال و پایداری پروتئین آلرژی‌زا اطلاعات مفیدی جهت انتخاب سیستم بیان ژن در اختیار ما قرار می‌دهند (۳۲). برای مثال باکتری E.coli میزبان مناسبی برای بیان پروتئین‌هایی است که گلیکوزیله نیستند و یا گلیکوزیلاسیون در آلرژی‌زایی این پروتئین‌ها نقشی ندارد. در برخی موارد ژن مورد نظر (cDNA) مستقیماً داخل وکتور مناسب کلون می‌شود ولی در برخی موارد پروتئین‌های مختلفی (مثل پروتئازها) در شکل‌گیری نهایی پروتئین نقش دارند. در این موارد باید این پروتئین‌ها هم بیان شوند تا در نهایت پروتئین آلرژی‌زا شکل و کارایی خود را حفظ کند. معمولترین روش تولید پروتئین‌ها در E.coli بیان سیتوزولیک می‌باشد. مقدار زیادی پروتئین محلول در مورد برخی آلرژی‌زاها ایجاد می‌شود. در برخی موارد هم پروتئین‌ها به صورت غیرمحلول در اینکلوژن بادی‌ها (IB) قرار می‌گیرند. انتخاب سیستم‌های مختلف وکتور و میزبان می‌تواند روی سیر تولید پروتئین سیتوزولی محلول یا تشکیلIB تأثیر داشته باشد. القای بیان ژن با دمای بالا (۴۲°C) بیشتر باعث تشکیل پروتئین‌ها در IB می‌شود؛ در حالی که استفاده از IPTG در دمای پایین (۲۸°C) باعث تشکیل پروتئین‌ها در سیتوپلاسم می‌گردند. پروتئین نوترکیب می‌تواند به همراه دنباله‌ای از توالی‌هایی از اسید آمینه (مثل هیستیدین) بیان شود که این توالی‌ها در خالص‌سازی پروتئین نوترکیب مفید خواهند بود (۳۵،۳۲).

تغییرات پس از ترجمه

از جمله تغییرات پس از ترجمه گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها می‌باشد که برای واکنش با IgE در برخی موارد ضروری نیست. اما در برخی موارد بخصوص وقتی که از آلرژی‌زا برای مقاصد تشخیصی استفاده می‌شود، گلیکوزیلاسیون پروتئین نوترکیب باید در نظر گرفته شود؛ برای مثال فرم طبیعی phl p13 (یکی از آلرژی‌زاهای گیاه تیموتی) که بسیار گلیکوزیله است، با سرم ۵۰٪ افراد حساس به گرده گیاهان واکنش نشان می‌دهد؛ در حالی که فرم غیرگلیکوزیله آن فقط با سرم ۲۵٪ از افراد حساس واکنش نشان می‌دهد (۳۴).

پروتئین‌های نوترکیب گلیکوزیله را می‌توان در بسیاری از سیستم‌های بیان ژن یوکاریوتی مثل مخمر پیکیا پاستوریس (Pichia Pastoris) ایجاد نمود؛ البته در برخی موارد گلیکوزیلاسیونی که به این ترتیب ایجاد می‌شود ،کاملاً شبیه نوع طبیعی آن نمی‌باشد. انواع مختلف گلیکوزیلاسیون و وزن مولکولی بالای قسمت قندی ممکن است مشکلاتی را در تشخیص و ایمونوتراپی ایجاد نماید. ولی در برخی موارد مانندDer f 1 (یکی از آلرژی‌زاهای مایت خانگی) مقدار زیاد گلیکوزیلاسیون روی واکنش به IgE تأثیری ندارد (۳۲).

حلالیت

مهمترین خصوصیتی که برای یک پروتئین آلرژی‌زای نوترکیب، علاوه بر خلوص و پایداری در نظر گرفته می‌شود، حلالیت آن می‌باشد. اگر حلالیت پروتئین به گلیکوزیله بودن نوع طبیعی آن بستگی داشته باشد، باید از سیستم‌های بیان ژن یوکاریوتی استفاده شود. معمولا آلرژی‌زاهای بدون سیستئین بخوبی و با فولدینگ مناسب در سیتوزول E.coli بیان می‌شوند. پروتئین‌های حاوی سیستئین معمولاً بیشتر در

IBها بیان می‌شوند (۳۲).

خالص‌سازی پروتئین نوترکیب

از روشهای مختلفی برای خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود. یکی از روشهای شاخص که برای تخلیص پروتئین‌ها بخصوص پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرد، روش ایمونوافینیتی کروماتوگرافی می‌باشد. در این روش از آنتی‌بادی اختصاصی پروتئین مورد نظر استفاده می‌شود. این آنتی‌بادی به صورت کووالانت به مرحله ثابت متصل شده است. این روش از قدرت تفکیک، ویژگی و بازدهی بالایی برخوردار می‌باشد و در زمان کوتاهی قابل انجام است. متال افینیتی کروماتوگرافی روشی است که برای خالص نمودن پروتئین‌هایی که در انتهای آنها یک توالی ۶ تایی از اسیدآمینه هیستیدین بیان شده، به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از این توالی هیستیدین، یک توالی برش آنزیمی خاص هم وجود دارد تا پس تخلیص، توالی هیستیدین با استفاده از آنزیم برش‌دهنده مناسب جدا شود. پروتئین نوترکیب از طریق هیستیدین‌های انتهایی به نیکل موجود در ستون کروماتوگرافی متصل شده و از مخلوط جدا می‌شود (۳۵). روش دیگر خالص‌سازی پروتئین‌ها، کروماتوگرافی، تعویض یونی می‌باشد. اساس کار آن میان کنش مولکول‌های باردار محلول و مولکول‌های با بار مخالف که با پیوند کووالان روی یک ماتریکس متصل شده‌اند، می‌باشد (۳۶). روش دیگر کروماتوگرافی میان‌کنش هیدروفوبیک می‌باشد که اساس کار آن بر میان‌کنش بین گروههای غیرقطبی سطح بیومولکول‌ها و لیگاندهای هیدروفوبیک فاز ثابت می‌باشد.

رسوب پروتئین‌ها توسط نمکهای خنثی روش دیگری است که برای خالص‌کردن پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرد. معمولاً از سولفات آمونیوم برای این منظور استفاده می‌شود. با استفاده از ژل فیلتراسیون می‌توان پروتئین‌ها را بر اساس وزن مولکولی و شکل فضایی تفکیک نمود. جدول ۴ مشخصات مختلف این روشها را با یکدیگر مقایسه نموده است.

خصوصیات فیزیکوشیمیایی آلرژی‌زا

آلرژی‌زاهای خالص‌شده با روشهای متعدد الکتروفورتیک و کروماتوگرافی قابل آنالیز هستند. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)، یک روش آنالیتیکال مفید برای تجزیه و تحلیل خلوص پروتئین‌ها می‌باشد. پروتئین‌هایی که ساختار سه بعدی آنها با ترکیبات احیاکننده شکسته شده به SDS متصل می‌شوند. SDS به پروتئین‌ها بار منفی می‌دهد و پروتئین‌ها فقط بر اساس وزن مولکولی در داخل ژل حرکت می‌کنند؛ همچنین می‌توان پروتئین‌ها را در یک گرادیان pH بر اساس pH ایزوالکتریک آنها جدا نمود.

برای بررسی دایمرهای پروتئینی، اثر آنزیم‌های پروتئولیتیک روی پروتئین و تنوع اشکال مختلف پروتئین از نوع دیگری از کروماتوگرافی به نام ژل فیلتراسیون یا الک مولکولی استفاده می‌شود.

جدول ٤- مقایسه چند روش خالص‌سازی پروتئین‌ها

روش خالص‌سازی	قدرت تفکیک	زمان	بازدهی	ویژگی
متال افینیتی کروماتوگرافی	++++	++++	++++	+++
ایمونوافینیتی کروماتوگرافی	++++	++++	++++	++++
کروماتوگرافی تعویض یونی	++	++	++	++
میان کنش هیدروفوبیک	++	++	++	++
ژل فیلتراسیون	++	+	+	+
رسوب پروتئین‌ها با نمک	+	++++	++	+

فعالیت بیولوژیک آلرژی‌زا

ساختار آلرژی‌زاهای نوترکیب ایجادشده برای مقاصد تشخیصی یا درمانی باید تا حدّ امکان شبیه نوع طبیعی آنها باشد و همانند نوع طبیعی خود با IgE واکنش دهد (۳۹،۳۸) و باعث بیدانه شدن ماستوسیت‌ها و بازوفیل‌ها گردد. با استفاده از روش رهاسازی هیستامین می‌توان این مهم را مشخص نمود.

بی‌خطر بودن آلرژی‌زاهای نوترکیب

امکان آلودگی سلول میزبانی که آلرژی‌زاهای نوترکیب در آن بیان می‌شود، باید مورد بررسی قرار گیرد. این آلودگیها می‌توانند اثرات پاتولوژیک داشته باشند. از نظر تئوری آلودگی با اسیدهای نوکلئیک می‌تواند باعث خطراتی شود. این امکان وجود دارد که قطعات DNA نوترکیب وارد ژنوم سلول‌های بیمار گردد. پروتئین‌های نوترکیبی که در سلول‌های میزبان گیاهی و یا جانوری بیان می‌شوند، ممکن است آلوده به ویروس باشند. امکان آلودگی به عامل آنسفالوپتی حیوانات هم باید در نظر گرفته شود. بر همین اساس تا حدّ امکان از کاربرد مواد شیمیایی با منشأ حیوانی باید پرهیز شود و در صورت ضرورت باید مأخذ حیوانات، بررسی و عدم وجود بیماری و روش استفاده از آن ثبت شود. استفاده از مدل‌های حیوانی جهت بررسی سمّیت، تعیین دوز و راه تجویز آلرژی‌زاهای نوترکیب ضروری به نظر می‌رسد (۴۱،۴۰).

پتانسیل آلرژی‌زاهای نوترکیب برای تشخیص آلرژی

اساسی‌ترین سؤال مطرح در مورد استفاده از آلرژی‌زاهای نوترکیب در تشخیص و درمان آلرژی، این نکته است که آیا این پروتئین‌های نوترکیب همانند نوع طبیعی خود توانایی اتصال به IgE را دارند؟ ممکن است عواملی مانند شکل‌گیری (Folding) نادرست و عدم ایجاد تغییرات پس از ترجمه و یا کلون‌شدن ایزوفرم‌ها، تغییراتی در ظرفیت اتصال آلرژی‌زاهای نوترکیب به IgE اختصاصی ایجاد نماید (۴۲). با این حال آلرژی‌زاهای نوترکیبی با ظرفیت مشابه اتصال به IgE و یا حتی ظرفیت بیشتر از نوع طبیعی آن ساخته شده است (۴۳-۴۵). برای مثال، تحقیقات نشان داده است که تشخیص سرمی برونکوپولمونواری آسپرژیلوز آلرژیک به وسیله آلرژی‌زای نوترکیب بهتر از عصاره طبیعی است (۴۶).

با ایجاد مجموعه‌ای از آلرژی‌زاهای نوترکیب خالص استاندارد شده امکان تشخیص اختصاصی آلرژی با استفاده از روشهای مختلفی از جمله سیستم CAP Pharmacia فراهم شده است (۴۷). با این روشها ارتباط بین IgE سرمی و نتایج حاصل از آزمون پوستی بررسی می‌شود. این نوع تشخیص آلرژی بر اساس مولکول‌های آلرژی‌زا، دورنمایی از ایجاد مخلوط چندین پروتئین نوترکیب اختصاصی برای هر بیمار جهت ایمونوتراپی فراهم می‌کند. پروتئین‌های آلرژی‌زای نوترکیب با موفقیت و بدون ایجاد عارضه جانبی جهت ایمونیزه کردن افراد حساس به نیش زنبور به کار گرفته شده‌اند. بدیهی است که تایید نهایی عملکرد آلرژی‌زاهای نوترکیب به وسیله مطالعات بالینی انجام می‌شود (۴۸).

ساده‌ترین وکم‌خطرترین آزمایش برای بررسی آلرژی‌زایی یک آلرژی‌زای نوترکیب، آزمون پوستی است. اولین آزمون پوستی آلرژی‌زاهای نوترکیب در سال ۱۹۹۲ انجام شد (۲۰) و اخیراً کارهای بیشتری در این زمینه انجام شده است.

همان‌طور که اشاره شد آلرژی‌زاهای زیادی از گرده گیاهان، مایت‌ها، قارچ‌های مختلف، سمّ زنبور، کرفس و لاتکس توسط آزمون پوستی مورد ارزیابی قرار گرفته است (۴۹-۵۲). نتایج اولیه از تحقیق ما در مقایسه آلرژی‌زای نوترکیب خربزه با نوع طبیعی آن نشان‌دهنده قابلیت بالای آلرژی‌زای نوترکیب در تشخیص بیماری آلرژیک می‌باشد (۵۴،۵۳).

آزمون پوستی توسط آلرژی‌زاهای نوترکیب

ویژگی یک آلرژی‌زا مهمترین معیار برای تشخیص

اختصاصی آلرژی می‌باشد. تشخیص آلرژی توسط آلرژی‌زاهای نوترکیب کاملاً اختصاصی است ولی ممکن است حساسیت‌های خفیف از نظر دور بماند. در مطالعات مختلف آلرژی‌زاهای نوترکیب و عصاره‌های مواد آلرژی‌زا از نظر ایجاد علائم بالینی مقایسه شده‌اند (۵۵). آلرژی‌زاهای نوترکیب برای آزمون پوستی ۱۰۰٪ اختصاصی هستند. با این حال حساسیت آزمون پوستی با آلرژی‌زاهای نوترکیب کمتر از عصاره‌های طبیعی است. دلیل این امر پایین‌تر بودن شیوع آلرژی به یک مولکول واحد از مجموعه مولکول‌های یک عصاره در جمعیت مورد مطالعه می‌باشد. مطالعات موازی مختلف نشان داده است که با افزایش تعداد آلرژی‌زاهای نوترکیب مختلف در یک مخلوط از آلرژی‌زاهای نوترکیب، میزان حساسیت افزایش پیدا می‌کند و در صورت رسیدن به تعداد مولکول‌های موجود در عصاره ماده آلرژی‌زا، حساسیت آن به ۱۰۰٪ می‌رسد و در کنار ویژگی خوب، آلرژی‌زاهای نوترکیب امکان تشخیص مطلوب آلرژی را فراهم می‌نمایند.

استفاده از آلرژی‌زاهای نوترکیب جهت تعیین IgE

از آنجا که آلرژی‌زاهای نوترکیب پروتئین‌هایی کاملاً خالص هستند، می‌توانند به صورت تجاری برای اندازه‌گیری IgE اختصاصی مورد استفاده قرار گیرند.

آلرژی‌زاهای نوترکیب بسیاری به صورت تجاری در سیستم CAP شرکت فارماسیا در دسترس هستند. مطالعات نشان می‌دهد نتایج آزمونهای ایمونولوژیک CAP با نتایج آزمون‌های پوستی و داخل پوستی و ELISA هماهنگی دارد. در بسیاری از موارد از جمله آلرژی‌زاهای نوترکیب قارچ آسپرژیلوس

(rAsp f5, rAsp f4, rAsp f3, rAsp f1) ارتباط مستقیم IgE سرمی و آزمون پوستی گزارش شده است؛ در حالی که در صورت استفاده از عصاره‌های قارچی، این ارتباط دیده نمی‌شود (۵۶).

بررسی فعالیت بازوفیل‌ها جهت تشخیص آلرژی

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، تشخیص ازدیاد حساسیت نوع یک، عمدتاً بر اساس یافته‌های بالینی، آزمون پوستی و اندازه‌گیری IgE اختصاصی می‌باشد. با این حال تعیین IgE اختصاصی به خودی‌خود نتایج قطعی در ارتباط با پاسخ سلول‌های مؤثر (Effector Cell) به آلرژی‌زای مربوطه در تمام بیماران در اختیار ما قرار نمی‌دهد. در مورد برخی بیماران تفاوتهایی بین آزمونهای بیولوژیک (آزمون پوستی) و سرولوژیک مشاهده می‌شود که این امر می‌تواند به سلول‌های مؤثر و ایجاد پاسخ آلرژی مربوط باشد؛ همچنین مشخص شده که آلرژی‌زاهای مختلف بسته به ساختمان و وضعیت گلیکوزیلاسیون، در برخورد با سلول‌های مؤثر و ایجاد پاسخ آلرژی بسیار متفاوت هستند. اخیراً مطالعات بیشتری روی فعال‌شدن سلول‌های پذیرنده IgE (بازوفیل‌های خون محیطی) که به وسیله آلرژی‌زا فعال شده‌اند، متمرکز شده است. این سلول‌ها واجد گرانول‌های حاوی واسطه شیمیایی (هیستامین) هستند. از طرفی در سطح این سلول‌ها گیرنده‌هایی با تمایل زیاد برای اتصال به IgE وجود دارد؛ هنگامی که این گیرنده‌ها از طریق IgE به یک آلرژی‌زا متصل می‌شوند، بازوفیل واسطه‌های شیمیایی خود را به فضای خارج سلولی ترشح می‌کند و به این وسیله باعث ایجاد علائم آلرژی در افراد حساس می‌شود. این واکنش با استفاده از آلرژی‌زاهای طبیعی و نوترکیب در محیط In vitro انجام‌پذیر است و می‌توان از آن برای بررسی و اندازه‌گیری فعالیت بازوفیل‌ها در برخورد با آلرژی‌زا استفاده نمود (۵۷).

در سالهای اخیر سه روش برای بررسی فعالیت بازوفیل‌ها در پاسخ آلرژی جهت تشخیص بیماری آلرژی پایه‌ریزی شده است.

آزمون آزادسازی هیستامین

با بهره‌گیری از آلرژی‌زاهای نوترکیب امکان ترشح هیستامین از بازوفیل‌های پذیرنده IgE مشخص می‌شود.

هنگامی که گیرنده‌های IgE روی بازوفیل‌ها با واسطه IgE (یا آنتیIgE آنتی‌بادی) به آلرژی‌زا متصل می‌شوند، سلول دگرانوله می‌گردد و واسطه‌های شیمیایی خود را به فضای خارج سلولی ترشح می‌کند.

واکنش آزاد سازی هیستامین، یک واکنش وابسته به دوز می‌باشد. منحنی معمول آن به شکل یک زنگوله ترسیم می‌شود (شکل ۷). ظرفیت آزادسازی هیستامین به عوامل مختلفی بستگی دارد؛ از جمله می‌توان به ماهیت بیماری (در آتوپی‌های شدید معمولاً مقدار زیادی ترشح هیستامین مشاهده می‌شود)، دریافت داروها قبل از انجام آزمون، وجود هورمون‌ها و سایتوکاین‌ها اشاره کرد. علاوه بر اینها تقریباً ۵٪ افراد به این آزمون پاسخ نمی‌دهند. امروزه عقیده بر این است که این افراد دارای نقص در مسیر سیگنال IgE–گیرنده هستند.

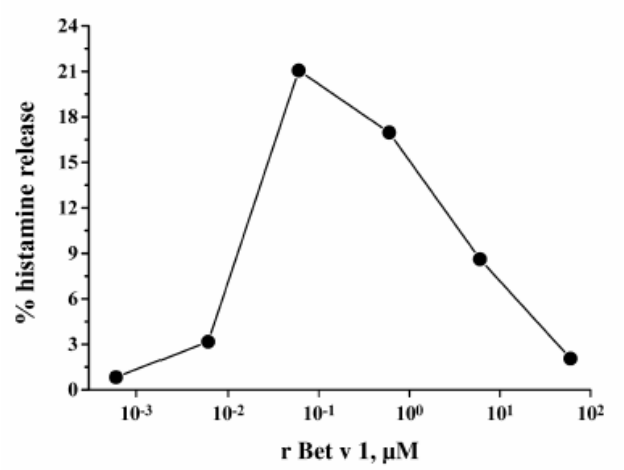
این آزمون با عصاره‌های تام یا آلرژی‌زاهای نوترکیب قابل انجام است. امروزه توصیه می‌شود که در این آزمون حتی الامکان از آلرژی‌زاهای نوترکیب استفاده شود (۵۸).

آزمون سنجش میزان CD63 سطح بازوفیل

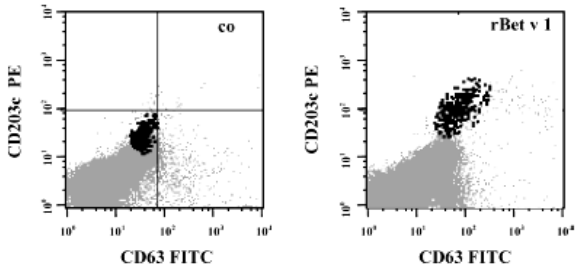
CD63 آنتی‌ژنی است که در سطح بسیاری از سلول‌های میلوئیدی از جمله بازوفیل‌ها و مونوسیت‌ها بیان می‌شود. مقدار این آنتی‌ژن در سطح بازوفیل‌ها اندک می‌باشد ولی در صورت تماس با آلرژی‌زا یا آنتیIgE آنتی‌بادی بازوفیل‌ها مقدار زیادی از این آنتی‌ژن را در سطح خود بروز می‌دهند. در سالهای اخیر این آنتی‌ژن در سطح بازوفیل با روشهای فلوسایتومتریک اندازه‌گیری می‌شود؛ بنابراین با بهره‌گیری از بیان CD63، پاسخ بازوفیل‌ها به آلرژی‌زاهای نوترکیب در افراد حساس قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

آزمون اندازه‌گیری CD203c

آنزیم اکتونوکلئوتید پیروفسفاتاز (ENPP-3,CD203c) فقط در سطح بازوفیل‌های انسان بیان می‌شود و می‌توان از آن به عنوان شاخصی برای تعیین بازوفیل‌ها استفاده کرد. در برخورد با IgE مقدار این آنتی‌ژن به سرعت افزایش می‌یابد؛ بنابراین در افراد حساس، برخورد با آلرژی‌زا یا آنتیIgE با افزایش مقدار CD203c همراه است. این افزایش یک واکنش وابسته به مقدار و زمان است. (شکل ۸) افزایش وابسته به مقدار CD203c را در برخورد با آلرژی‌زا نوترکیب Bet v 1 نشان می‌دهد. آلرژی‌زاهای طبیعی و نوترکیب قادر به ایجاد افزایش بیان CD203c هستند؛ با این حال امروزه توصیه می‌شود که حتی الامکان از آلرژی‌زاهای نوترکیب استفاده شود (۵۹). افزایش میزان این آنزیم در سطح بازوفیل‌ها در نمونه خون با استفاده از روش فلوسایتومتری قابل اندازه‌گیری است.



شکل ۷- آزادسازی هیستامین از بازوفیل در مجاورت Bet v1 نوترکیب در یک فرد آلرژیک. بازوفیل‌ها با غلظتهای مختلف rBet v 1 انکوبه شده‌اند (۵۸).



شکل ۸- افزایش بیان CD63 و CD203c در بازوفیل‌های فرد آلرژیک. بازوفیل‌ها در گروه شاهد (چپ) و در مجاورت r Bet v 1 (راست) به مدت ده دقیقه انکوبه گردیدند (۵۹).

بازوفیل‌های یک فرد حساس، به صورت جداگانه در مجاورت آلرژی‌زای نوترکیب Bet v 1 و نمونه کنترل قرار گرفته است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان هر دو آنتی‌ژن CD63 و CD203c هنگام مجاورت با آلرژی‌زای نوترکیب Bet v 1 افزایش داشته است. این روشها (رهاسازی هیستامین، در سطح CD63 و CD203c) می‌توانند به عنوان روش تاییدی برای اثبات آلرژی افراد به یک آلرژی‌زای خاص مورد استفاده قرار گیرند.

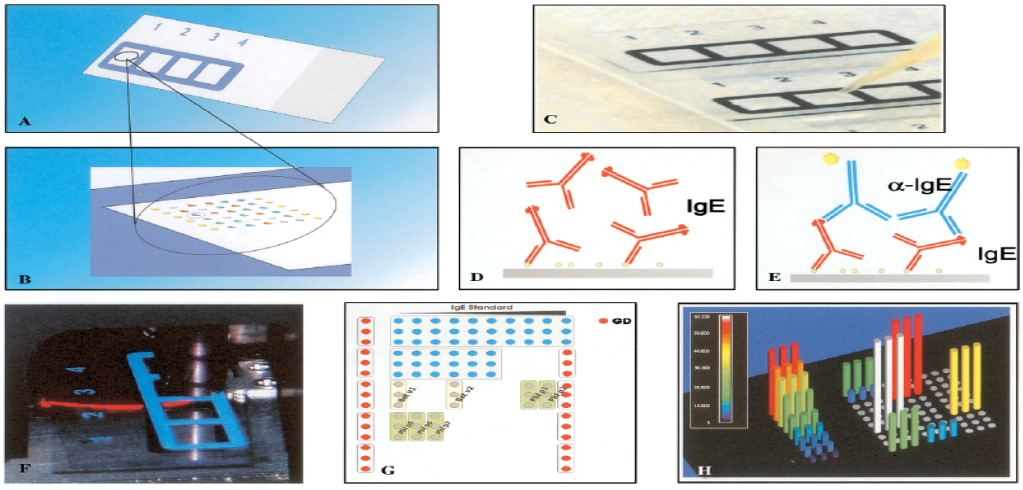
استفاد از مخلوطی از آلرژی‌زاهای مختلف به منظور تشخیص آلرژی

همان‌طور که اشاره شد یکی از عمده ترین مزایای آلرژی‌زاهای نوترکیب خالص بودن این ترکیبات می‌باشد. این آلرژی‌زاها کاملاً اختصاصی هستند و در مقادیر مختلف قابل استاندارد کردن می‌باشند. بر خلاف عصاره‌های آلرژی‌زای طبیعی که از نظر مولکول‌های آلرژی‌زا متفاوت هستند، آلرژی‌زاهای نوترکیب در مقایر کاملاً مشخص تولید می‌شوند؛ بنابراین کاملاً منطقی به نظر می‌رسد که یک مخلوط آلرژی‌زای مایت نوترکیب (یا آلرژی‌زای دیگر) تولید کنیم که غلظت آلرژی‌زاهای آن مشخص می‌باشد. با دقت در انتخاب آلرژی‌زا و دقت در تعیین ترکیبات مخلوط آلرژی‌زایی، این مخلوط از نظر آلرژی‌زایی کاملاً مشابه نوع طبیعی خود خواهد بود (۱۸). مزیت این مخلوط آلرژی‌زای نوترکیب این است که هر آلرژی‌زا غلظت مشخصی دارد و عاری از هر گونه پروتئین غیر آلرژی‌زا، ماکرومولکول‌ها و یا آنزیم‌ها می‌باشد. از طرفی آلرژی‌زاهای نوترکیب خطر وجود عوامل عفونی در عصاره‌هایی که از منابع حیوانی تهیه می‌شوند را برطرف می‌سازد.

برای بیشتر منابع آلرژی‌زای مهم (مایت‌ها، گرده‌ها، غذاها و ...) مخلوط آلرژی‌زاهای مختلف برای تشخیص آلرژی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۵۹).

آلرژی‌زاها و ریزتراشه (Microarray)

پیشرفتهای چشمگیری در زمینه فناوری ریزتراشه (Microchip) انجام شده است (شکل ۹). از این فناوری جهت تشخیص سریع آلرژی استفاده می‌شود (۵۹). تعداد زیادی‌آلرژی‌زای‌نوترکیب (تا چندهزارعدد) روی این‌ریزتراشه‌ها متصّل می‌شوند و در اثر مجاورت با سرم بیمار و واکنش IgE اختصاصی با آلرژی‌زای مربوطه، وضعیت آلرژی فرد مورد بررسی قرار می‌گیرد (۶۰). با استفاده از این فناوری می‌توان وضعیت IgE اختصاصی علیه ۴۰۰ آلرژی‌زا را فقط با استفاده از ۲۰ میکرولیتر سرم فرد بیمار تعیین کرد (۶۲،۶۱)؛ بنابراین یکی از مزایای این میکروچیپ‌ها تعیین IgE اختصاصی برای تعداد زیادی آلرژی‌زا در یک بار آزمایش می‌باشد (۶۳).



شکل ۹- مراحل مختلف استفاده از ریزتراشه‌ها جهت تشخیص اختصاصی آلرژی با استفاده از سرم بیمار (۶۱)

هر ریزتراشه شامل ۴ چاهک واکنش (برای چهار بیمار) می‌باشد که هر چاهک با تعداد زیادی آلرژی‌زای نوترکیب پوشیده شده است (A و B). هر چاهک ریزتراشه با ۲۰ میکرولیتر سرم بیمار انکوبه می‌شود تا IgE اختصاصی به آلرژی‌زای مربوطه متصل گردد (D وC). در مرحله بعد ردیابی IgE بیمار متصل‌شده به آلرژی‌زاها توسط Anti-IgE نشاندار انجام می‌گردد (E). با استفاده از اسکنر لیزری محلهای اتصال Anti-IgE نشاندار شناسایی می‌شود (F). هر آلرژی‌زا یک کالیبراسیون استاندارد برای IgE دارد (G). در مرحله نهایی استفاده از یک سیستم نرم‌افزاری و رسم منحنی استاندارد امکان آنالیز کمی داده‌ها جهت تعیین IgE اختصاصی فراهم می‌شود (H).

نتیجه‌گیری

پیشرفت علوم باعث اختصاصی‌تر شدن تشخیص و درمان بسیاری از بیماریها شده است. بیماریهای آلرژیک نیز از این امر مستثنی نیستند. استفاده از آلرژی‌زاها در تعدادی از کشورها برای تشخیص اختصاصی بیماریهای آلرژیک به صورت رایج در حال استفاده می‌باشد. به نظر می‌رسد که در سالهای آینده کاربرد این آلرژی‌زاها جهت تشخیص، فراگیر خواهد شد. تولید آلرژی‌زاها به صورت نوترکیب و امکان استفاده از فناوری ریزتراشه استفاده از این آلرژی‌زاها را برای تشخیص هرچه بهتر و دقیقتر ترغیب خواهد نمود. اما در این میان هر کشور یا منطقه نیاز به شناسایی و تولید آلرژی‌زاهای بومی خود جهت استفاده از این فناوری دارند.

منابع:

1- Valenta R, Kraft D. Recombinant allergens: from production and characterization to diagnosis, treatment, and prevention of allergy. Methods. 2004; 32: 207–208.

2- Bungy GA, Mossawi J, Nojoumi SA, Brostoff J. Razi's report about seasonal allergic rhinitis (hay fever) from the 10th century AD. Int Arch Allergy Immunol. 1996; 110:219-24.

3- Johannes Ring. Allergy and hypersensitivity, Allergies on the increase, Current Opinion in Immunology 2001; 13: 699- 700

4- Fereidouni M, Sankian M, Varasteh AR. The prevalence of saffron pollen allergy in saffron workers of Khorasan (Iran) in 2002. J Kerman Univ Med Sci 2002;.1: 7-13.

5- Khazaei HA, Hashemi SR, Aghamohamadi A, Farhoudi F. The Study of type 1 allergy prevalence among people of south-east of Iran by skin prick test common allergens. Iranian J Allergy, Asthma and Immunology. 2003; 2: 3-7.

6- Farid R, Bahrami A, Ghorashi-Al Hosseini J. Aeroallergens in northeastern Iran. Annals Allergy. 1991; 66: 235-36

7- Mario Plebani. Clinical value and measurement of specific IgE. Clini Biochemistry. 2003; 36: 453-69.

8- Holt PG. Environmental factors and primary T-cell sensitization to inhalant allergens in infancy: reappraisal of the role of infections and air pollution. Pediatr Allergy Immunol. 1995;6: 1-10.

9- van Hage-Hamstena M, Pauli G. Provocation testing with recombinant allergens. Methods. 2004: 32: 281-91.

10- Varasteh A, Salimi M. Purification of IgE from human sera. Iranian J Basic Medi Sci. 2000; 2:4: 207-24.

11- Varasteh A, Samei A. Development of an ELISA method for the detection of specific IgE to Saffron allergens in human serum. Faz J. 2000; 13: 1-6.

12- Tavallaee Sh, Sankian M, Kaghazian H, Varasteh Ab. Minimizing the nonallergic material in saffron pollen extract by changing the conditions of extracting technique. J BUMS. 2000; 7 (1): 18-21.

13- Mullbatcher A, Eichner RD: Immunosuppression in vitro by a metabolite of pathogenic fungus. Proc Natl Acad Sci USA. 1984; 81:3835-37.

14- Esch RE. Allergen source materials and quality control of allergenic extract. Methods. 1997; 13: 2-13.

15- Portnoy J, Pacheco F, Barnes C. The effect of time and extraction buffers on residual protein and allergen content of extract derived from four strain of Alternaria. J Allergy Clin Immunol. 1993; 91; 930-38.

16- Nelson HS, Ikle D, Buchmeier A. Study of allergen extract stability; the effect of dilution and mixing. J Allergy Clin Immunol. 1996; 98: 382-88.

17- Vieths S, Hoffmann A, Muller U. Reimdel J, Houstein D. Factors influencing the quality of food extracts for in-vitro and in-vivo diagnosis. Allergy. 1998; 53:65-71.

18- Schmid-Grenelmeier P, Crameri R. Recombinant allergens for skin test. Int Arch Allergy Immunol. 2001; 125 (2): 96-111.

19- International Union of Immunological Societies. Allergen nomenclature sub-committee. Available From: www.allergen.org. 2006.

20- Varasteh A, Oskoui M, Farid R, Rowhani M. Determination of Saffron allergenicity. Iranian J Basic Med Sci. 2000; 3 (1): 33-37.

21- VarastehAR , Kaghazian H, Tayebi D, Moghadam M, Sankian M. Immunoblot analysis of saffron proteins recognized by human IgE antibodies. Iranian J Basic Med Sci. 2005; 7:12-16.

22- Varasteh AR, Akhlaghi F, Shakeri Kermani T, Sankian M, Freydouni M. The comparison of clinical pattern of saffron pollen allergy with other plant allergen. J BUMS. 2002; 10: 25-28.

23- VarastehAR , Vahedi F, Kaghazian H, Sankian M, Shirazi F, Arefi M. Development of an indirect ELISA for detection of specific IgG subclasses for Saffron pollen allergens. Iranian J Basic Med Sci. 2005; 8: 50-54.

24- Golsaz Sahirazi F, Varasteh AR, Sankian M, Moghadam M. Purification of monoclonal antibody against saffron pollen Profilin. Iranian J Allergy. 2006; 3: 4-8.

25- Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. J Allergy Clin Immunol. 2004; 113: 821-30

26- Kazemi-Shirazi L, Niederberger V, Valenta R. Recombinant marker alergens: Diagnostic gatekeepers for the treatment of allergy. Int Arch Allergy Immunol. 2002; 127: 259-68.

27- Sankian M, Varasteh AR, Pazouki N, Mahmoudi M. Sequence homology: a poor predictive value for profilins cross-reactivity. Clin Molecular Allergy. 2005; 3**:** 1-9.

28- Wallner M, Gruber P, Radauer Ch, Maderegger B, Susani M, Hoffmann-Sommergruber H et al. Lab scale and medium scale production of recombinant allergens in Escherichia coli. Methods. 2004; 32: 219-26.

29- Barderas R, Purohit A, Papanikolaou I, Rodrı´guez R, Pauli G, Villalba M. Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1. J Allergy Clin Immunol. 2005; 115: 351-57.

30- Pittner G, Vrtala S, Thomasw WR, Weghofer M, Kundiz M, Horak F, et al. Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens. Clin Experimen Allergy. 2004; 34:597-603

31- Sankian M, Varasteh AR, Esmail N, Moghadam M, Pishnamaz R, Mahmoudi M. Melon allergy and allergenic cross reactivity of melon with other allergens. Iranian J Basic Med Sci. 2002; 6: 323-29.

32- Cromwell O, Suck R, Kahlert H, Nandy A, Weber B, Fiebig H. Transition of recombinant allergens from bench to clinical application. Methods. 2004; 32: 300-12.

33- Enaut AH, Danchin Escherichia coli and Salmonella typhimurium. In: Neidhardt F, Curtiss R, Ingraham J, Lin E, Low B, Magasanik B, et al. Cellular and molecular biology. USA: American Society for Microbiology; 1996. pp: 2047-66.

34- Fiebig H, Suck R, Kahlert H, Weber B, Altmann F. Allergie 2000: probleme, stategien und praktische knsequenzen. USA: Munich-Deisenhofen; 2001. pp: 75-82.

35- Arefi M, Farid Hossini L, Sankian M, Moghadam M, Farid Hossaini R, Varasteh AR. Purification of natural and recombinant melon profilin using affinity chromatography. Iranian J Allergy. 2006; 3: 213-16.

36- Karlsson E, Ryden L, Brewer J. Protein purification, principles, high resolution methods, and applications. New York: Wiley-VCH; 1998. pp: 145-205.

37- Dunn BM. Current protocols in protein Science. New York: Wiley; 1997. pp. 841-61.

38- Ferrari E, Tsay A, Eggleston PA, Spisni A, Chapman MD. Environmental detection of mouse allergen by means of immunoassay for recombinant Mus m 1. J Allergy Clin Immunol. 2004; 9: 341-46.

39- Hoffmann-Sommergruber K, Demoly P, Crameri R, Breiteneder H, Ebner Ch. Margit laimer da camara machado, kurt blaser, chaim ismail, otto scheiner, jean bousquet, and günther menz. IgE reactivity to Api g 1, a major celery allergen, in a central european population is based on primary sensitization by Bet v 1. J Allergy Clin Immunol. 1999; 104: 478-84.

40- CPMP/ICH/286/95 (M3) Note for guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals. Available from: www.emea.eu.int/sitemap.htm.

41- Solouki Pour S, Arefi M, Moghadam M, Sankian M, Varasteh AR. Allergenicity of recombinant of melon (rCuc m 2), in Balb/C mice by subcutaneous immunization. Iranian J Immunol. 2006; 3: 12-16.

42- Bohlea B, Vieths S. Improving diagnostic tests for food allergy with recombinant allergens. Methods. 2004; 32: 292-99.

43- Chua KY, Kehal PK, Thomas WR, Macreadie IG. High-frequency binding of IgE to Der p allergen expressed in yeast. J Allergy Clin Immunol. 1992; 89: 95-102.

44- Heiss S, Mahler V, Steiner R, Spitzauer S, Schweiger Ch, Kraft D, et al. Component-resolved diagnosis (CRD) of type I allergy with recombinant grass and tree pollen allergens by skin testing. J Investigative Dermathol.1999; 5: 113-16.

45- Aruint O, Helbling A, Crameri R, Ferreira F, Pichler WJ. Reduced in vivo allrgenicity of Bet v 1d isoform, a natural component of birch pollen. J Allergy Clin Immunol. 1999; 104:1239-43.

46- Crameri R. Recombinant aspergilus fomigatus allergens: from the nucleotide sequences to clinical applications. Int Arch Allergy Immunol. 1998; 115: 99-114.

47- Crameri R, Lidholm J, Gronlund H, Mwnz G. Evaluation of the recombinant Aspergilus fumigatus allergen in the pharmacia Cap System. Clin Exp Allergy. 1996; 26: 1411-19.

48- Bilo BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F. Diagnosis of hymenoptera venom allergy. Allergy. 2005: 60: 1339-49.

49- Rossi RE, Monasterolo G; Monasterolo S. Measurement of IgE antibodies against purified grass-pollen allergens (Phl p 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, and 12) in sera of patients allergic to grass pollen. Allergy. 2001: 56: 1180-85.

50- Weber BK, Scheurer S, Fritsche Ph. Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy. J Allergy Clin Immunol. 2002 ;110:167-73.

51- Weber BK, Wangorschw A, Bohlez B, Kaulw S, Ku T. Component-resolved in vitro diagnosis in carrot allergy: Does the use of recombinant carrot allergens improve the reliability of the diagnostic procedure. Clin Exp Allergy. 2005; 35:970-78.

52- Bil BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. Allergy. 2005; 60: 1339-49.

53- Varasteh AR, Arefi M, Sankian M, Farid Hossaini K, Moghadam M, Farid Hossaini R. Diagnosis of melon allergy: comparison of total extract with natural and recombinant allergen. Iranian J Allergy. 2006; 3: 15-17.

54- Varasteh AR, Sankian M, Arefi M, Farid Hossaini L, Moghadam M, Farid Hossaini R. The allergen-based diagnosis as an alternative for total extract-baced diagnosis: Advantages and limitations, example of Persian melon. Iranian J Allergy, Asthma Immunol. 2005; 4: 17 20.

55- Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of componentresolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). Clin Experiment Allergy. 1999; 29: 896-904.

56- Van de Zee JS, de Groot H, van Swieten P, Jansen HM, Aalberse RC. Discrepancies between the skin test and IgE antibody assays: Study of histamine release, complement activation in vitro, and occurrence of allergen specific IgE. J Allergy Clin Immunol. 1988; 82: 270-81.

57- Erdman SM, Sachs B, Schmidet A, Merk HF, Scheiner O. In vitro analysis of birch pollen associated food allergy by Use of recombinant allergens in basophile activation test. Int Arch Allergy Immunol. 2005; 136:230-38.

58- Valent P, Alexander W. Hauswirth S, Wolfgang R. Assays for measuring in vitro basophile activation induced by

recombinant allergens. Methods. 2004; 32: 265-70.

59- Martin D. Chapman AM. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. J Allergy Clin Immunol. 2000; 10: 409-18.

60- Stewart J, Lebruna T, Wasinee N, Agnas Huia P, McLaughlin CS. Development of a sensitive, colorimetric microarray assay for allergen-responsive human IgE. J Immunological Methods. 2005; 300 24-31.

61- Jahn-Schmid B, Harwaneggw C, Hillerw R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, et al. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. Clin Exp Allergy. 2003; 33:1443-49.

62- Deinhofer K, Sevcik H, Balic N, Harwaneg Ch, Hiller R, Rumpold H, et al. Microarrayed allergens for IgE profiling. Methods. 2004; 32: 249-54.

63- Schmid B, Harwaneggw1 C, Hillerw R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, et al. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. Clin Exp Allergy. 2003; 33:1443-49.

Recombinant allergens as a new diagnostic tool for allergic diseases

A. Varasteh[1], M. Arefi[2]

Abstract

Almost 10 centuries ago, clinical symptoms of allergy were reported for the first time by the great Iranian sage and scientist, Zakariya Razi. However, his report was neglected because fatal infectious diseases were taken more seriously into account. About 1000 years after this report, infectious diseases were less dramatically propagated due to the improvement of hygienic conditions. Nowadays, prevalence of allergic diseases has increased more than ever before. This prevalence has imposed heavy charges on society. Thus, diagnosis and treatment of such diseases has gained particular importance .In Addition to recording patients' history, having skin prick test by applying natural extracts of allergens is among the oldest diagnostic methods. Using natural extracts, providing and standardizing of which is challenging, is often desirable in diagnosis of the allergic reactions. Developments in molecular biology, biochemistry, molecular biotechnology and genetic engineering techniques of preparing proteins has made it possible to identify and purify natural and recombinant allergens. The present paper, while presenting a brief review of diagnostic techniques of allergic diseases, pinpoints the role of recombinant allergens in promoting the applied techniques.

Key Words: Immunology; Recombinant allergens; Allergic diseases

[1] Corresponding Author; Associate Professor, Department of Immunology; Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences. Mashhad, Iran. varastehmajid@hotmail.com

[2] Researcher; Department of Immunobiochemistry; Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences. Mashhad, Iran.