

# آلرژی‌زاهای نوترکیب، ابزار نوین تشخیص بیماریهای آلرژیک

دکتر عبدالرضا وارسته<sup>۱</sup> - دکتر مجید عارفی<sup>۲</sup>

## 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 کمزنگ 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 قدمی‌ترین روشهای تشخیص است. استفاده از عصاره تام که مشکلات متعددی در فرآیند تهیه و استاندارد کردن 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 معرفی کوتاه به روشهای تشخیص بیماریهای آلرژیک، جایگاه آلرژی‌زاهای نوترکیب، در ارتقای کیفی این روشهای (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)

پذیرش: ۸۵/۷/۲۰

اصلاح نهایی:-

دریافت: ۸۵/۵/۱۱

<sup>۱</sup> نویسنده مسؤول؛ دانشیار گروه ایمونولوژی مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

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

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

<sup>۲</sup> محقق بخش ایمونوبیوشیمی مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

## مقدمه

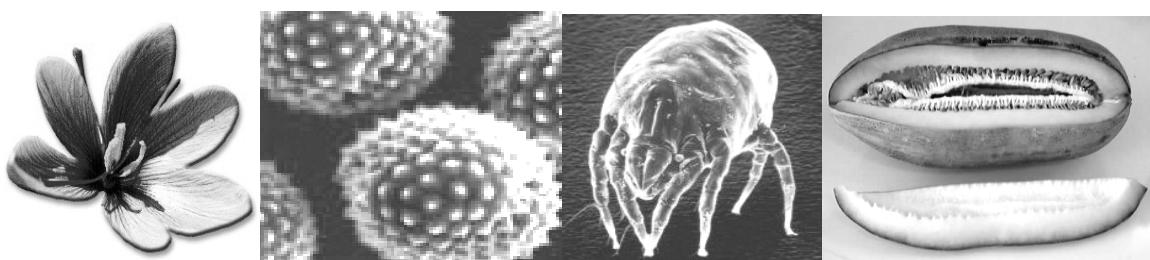
و روش زندگی انسان به وجود آمده، مرتبط دانست. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و تغییر فلور باکتریایی روده، آلودگی محیط زیست، چاقی و کم‌تحرکی افراد، می‌تواند از جمله این تغییرات باشد. تأثیر عفونتها بر روی بروز آلرژی از موارد بحث‌انگیز است. با وجود این که عفونتها باعث وخیم‌تر شدن علائم آسم می‌شوند، عقیده بر این است که گسترش بهداشت عمومی و کنترل بیماریهای عفونی در دهه‌های گذشته باعث افزایش آنژن‌های (آلرژی‌زاها) است (۷). شواهدی در دست است که نشان می‌دهد رعایت اصول بهداشتی در کشورهای صنعتی، عفونتها 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 آتوبیک، 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 (شکل ۱).

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

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 (رینوکترکتیویت آلرژیک، آسم و درماتیت آتوبیک) در اثر تولید آنتی‌بادی از کلاس IgE علیه آنژن‌های (آلرژی‌زاها) که به خودی خود بی‌ضرر 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 عالیقدار 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 کلی 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



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

که در جدول ۱ ارائه شده است، با استفاده از مواد آلرژی‌زا قابل انجام است؛ بدینهی 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 ماستوویت‌ها وجود داشته باشد، مولکول‌های آلرژی‌زا به این IgE‌ها متصل می‌شوند. بین ۵۰۰۰-۱۲۰۰۰ ماستوویت در هر میلیمتر مکعب در جوار عروق خونی و اعصاب برای ایجاد واکنش آلرژیک کافی می‌باشد. اتصال مولکول آلرژی‌زا به علامتی را به سلول ماستوویت 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 نورومدیاتور P از اکسون‌ها و منجر به قرمزی اطراف کهیر می‌گردد<sup>(۹)</sup>.

واکنش پوستی معمولاً ظرف ۵ دقیقه و پس از تزریق آلرژی‌زا آغاز می‌شود و به دنبال آن یک مرحله تاخیری وجود دارد که ۶-۲ ساعت بعد شروع می‌شود و ظرف ۶-۲ ساعت به حداقل خود می‌رسد و ظرف ۲۴-۴۸ ساعت بهبود می‌یابد<sup>(۹)</sup>.

### 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 اوزینوفیل‌ها 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 ماستوویت بیمار می‌تواند در تشخیص بیماری آلرژیک و شناسایی ماده آلرژی‌زا مفید واقع گردد.

روشهای رایج و اختصاصی تشخیص بیماریهای آلرژیک

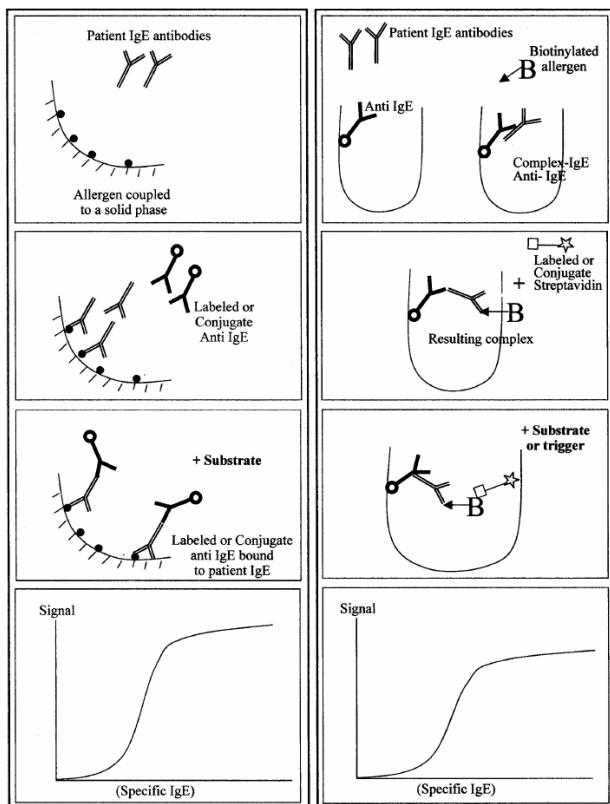
جدول ۱- روشهای رایج و اختصاصی تشخیص بیماریهای آلرژیک

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

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

\* Radio Allegro Sorbant Test

† Enzym Labeled Allergo Sorbant Test

میزان هیستامین آزادشده در واکنش ازدیاد حساسیت فوری به وسیله روش میکرودیالیز پوست مورد مطالعه قرار گرفته است. حداکثر غلظت هیستامین ۸-۴ 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<sub>2</sub> و لوکوتربین C<sub>4</sub> 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 نظری 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.

### In-vitro استفاده از آزمونهای

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 کمی پاسخ ایمنی و عدم تداخل دارویی و در مورد آزمونهای سرمی، امکان نگهداری طولانی‌مدت نمونه را می‌توان ذکر کرد.

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 امكان 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 آلرژی‌ Zahای 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 آلرژی‌ Zahای حاصل از مواد آلرژی‌زا 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 آلرژی‌زا 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 بر می‌دارند.

## 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

ساختار مواد آلرژی‌زا معمولاً پیچیده است و علاوه بر مولکول‌های آلرژی‌زا (در غلظتها 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 آلرژی‌ Zahها و مقدار آنها متفاوت هستند و نتایج متفاوتی را در آزمونهای اندازه‌گیری IgE و آزمون پوستی نشان می‌دهند (۱۷)؛ بنابراین استاندارد کردن عصاره‌های مواد آلرژی‌زا ضروری به نظر می‌رسد تا این که آزمونهای مختلف برای تشخیص آلرژی، از حساسیت و ویژگی یکسانی برخوردار باشند. امروزه عصاره‌ها عمدها بر اساس آلرژی‌ Zahای اصلی استاندارد می‌شوند. آلرژی‌ Zahای 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 آلرژی‌زا 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 سم 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 آلوودگی عصاره‌های طبیعی به آلرژی‌ Zahایی از سایر منابع نیز وجود دارد. کیفیت عصاره‌ها طی روند تهیه عصاره‌ها ممکن است تحت تأثیر پروتئازها تغییر کند. آنزیم‌های پروتئولیتیک ممکن است جزو آلرژی‌زا عصاره باشند یا نباشند، ولی به هر حال باعث تخریب پروتئین‌های عصاره می‌شوند و کیفیت عصاره را جهت مقاصد

(۲۳، ۲۴): اما خیلی زود محققین دریافتند که تخلیص و استاندارد کردن آلرژی‌ Zahahای 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 آلرژی‌ Zahahای نوترکیب آغاز گردید.

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

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

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

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

آلرژی‌ Zahای موجود در مواد آلرژی‌ Zahای مختلف می‌بایست شناسایی شوند. تا خرداد سال ۱۳۸۵، ۵۱۲ ماده آلرژی‌ Zah در مواد آلرژی‌ Zah مختلف گزارش شده است (جدول ۲). همانگونه که در جدول ۳ نشان داده شده است پروتئین‌های آلرژی‌ Zah دارای اعمال متابولیکی متفاوت هستند و در گروههای مختلف پروتئین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند.

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

یکی از این آلرژی‌ Zahها مربوط به آلرژی‌ Zahای اصلی، گرده (Crocus Sativus) Cro s 1 گیاه زعفران است که با نام ۲۰-۲۲ و دیگری، مربوط به میوه خربزه مشهد می‌باشد که با نام ۲ Cuc m (Cucumis Melo) ثبت شده است. این آلرژی‌ Zah 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 آلرژی‌ Zahahای مواد آلرژی‌ Zah، روش‌های اختصاصی (Specific IgE) جهت تعیین نوع آلرژی‌ Zah در گیر در بیماری و تشخیص بیماریهای آلرژیک راهاندازی شد

جدول ۲- آلرژی‌ Zahahای مواد مختلف آلرژی‌ Zahای شناسایی و ثبت شده تا خرداد ۱۳۸۵ در سایت allergen.org

تعداد آلرژی‌ Zahای شناخته شده	گرده گیاهان	مایت‌ها	حیوانات	حشرات	قارچ‌ها	خوارکیها	سایر	ماده آلرژی‌ Zah
۱۰۷	۴۷	۹۱	۲۷	۷۸	۱۳۱	۳۱		

آلرژی‌زاهای به وسیله فناوری NMR، کریستالوگرافی با اشعه X و یا مدل‌سازی رایانه‌ای شواهد مهمی 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 آلرژی‌زاهای نوع فعالیت بیولوژیک آنها مشخص شده است (۲۵).

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

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

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 آلرژی‌زا مختلف باشد.

شواهد نشان می‌دهند که شناسایی پروتئین‌های آلرژی‌زا توسط آنتی‌بادی IgE تا حدود زیادی به ساختار سه‌بعدی این پروتئین‌ها بستگی دارد. آلرژی‌سیسته پروتئین‌ها با ساختمان اول پروتئین‌ها، ارتباط مستقیم دارد؛ اما ساختمان سه بعدی

چند اپی‌توب وجود دارد. گاهی ممکن است مولکول‌های آلرژی‌زای مشابه موجود در چندین ماده آلرژی‌زا علاوه بر داشتن اپی‌توب‌های مشترک دارای اپی‌توب‌های اختصاصی نیز باشند؛ در این موارد در صورتی واکنش متقطع بروز می‌کند که یک فرد به اپی‌توب‌های مشترک مولکول‌های آلرژی‌زا حساس شده باشد اما در صورتی که واکنش فرد حساس، به یک اپی‌توب اختصاصی از مولکول آلرژی‌زا باشد، واکنش متقطع بروز پیدا نمی‌کند (شکل ۴).

مولکول‌های یکسان در مواد آلرژی‌زا می‌توانند منشأ واکنش متقطع 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 متقطع در یک فرد ایجاد خواهد شد که فرد به مولکول ۲ از میوه انگور یا مولکول ۴ از میوه خربزه حساس شده باشد.

انگور	خربزه
۱	۱
۲	۲
۳	۳
۴	۴

شکل ۳- پدیده واکنش متقطع در سطح مولکولی

## منشأ واکنش متقطع 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 متقطع می‌نامند. همان‌طور که در شکل ۳، مشخص شده است، چنان‌چه تشخیص اختصاصی به صورت In-vitro یا In-vivo 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 متقطع می‌توانند دارای ماهیت بسیار پیچیده‌ای باشند. بر روی یک مولکول آلرژی‌زا

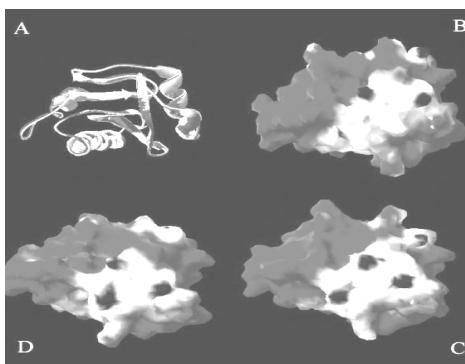


شکل ۴- نمایی از مولکول پروفیلین موجود در هندوانه و خربزه

ایمونوتراپی با کدام ماده آلرژی‌زا شروع شود. در این خصوص، استفاده از آلرژی‌ Zahای نوترکیب برای حل مشکل، در تشخیص و درمان بیماری‌های آلرژیک منطقی به نظر می‌رسد.

### تولید آلرژی‌ Zahای 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 آلرژی‌ Zahای اصلی و فرعی کلون و به صورت نوترکیب تولید شده‌اند (۲۸-۳۰). اغلب این آلرژی‌ Zahا در خواص بیوشیمیایی و توانایی تحریک پاسخ ایمنی با نوع طبیعی خود مشابه می‌باشند. تولید این پروتئین‌ها در میزانهای مختلف (باکتری، مخمر، گیاهان) انجام شده است. این پروتئین‌ها نوترکیب خالص شده، امکان تعیین ساختمان بعضی از آلرژی‌ Zahا را توسط روش‌های کریستالوگرافی و NMR فراهم نموده است. استفاده از داده‌های کریستالوگرافی این مولکول‌ها و نرم‌افزارهای مدل‌سازی، امکان پیشگویی ساختمان بسیاری از آلرژی‌ Zahای دیگر را فراهم ساخته است. تاکنون توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی صدها آلرژی‌ زا مشخص شده است. از این میان سه آلرژی‌ زا از بخش ایمونوبیوشیمی مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد گزارش شده است. برای درک بهتر چگونگی شناسایی و تولید یک آلرژی‌ زای جدید مثال آلرژی‌ زای خربزه، به صورت خلاصه توضیح داده می‌شود (۳۱).



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

در شکل ۴، اپی‌توب‌های اختصاصی پروفیلین خربزه به رنگ مشکی، اپی‌توب‌های اختصاصی پروفیلین هندوانه به رنگ سفید و اپی‌توب‌های 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 اپی‌توب مشترک حساس شده باشد. در تصویر فوق، اشکال هندسی (دایره، مثلث و ...) که در اطراف بیضی قرار گرفته‌اند، اپی‌توب‌های دو مولکول را نشان میدهند.

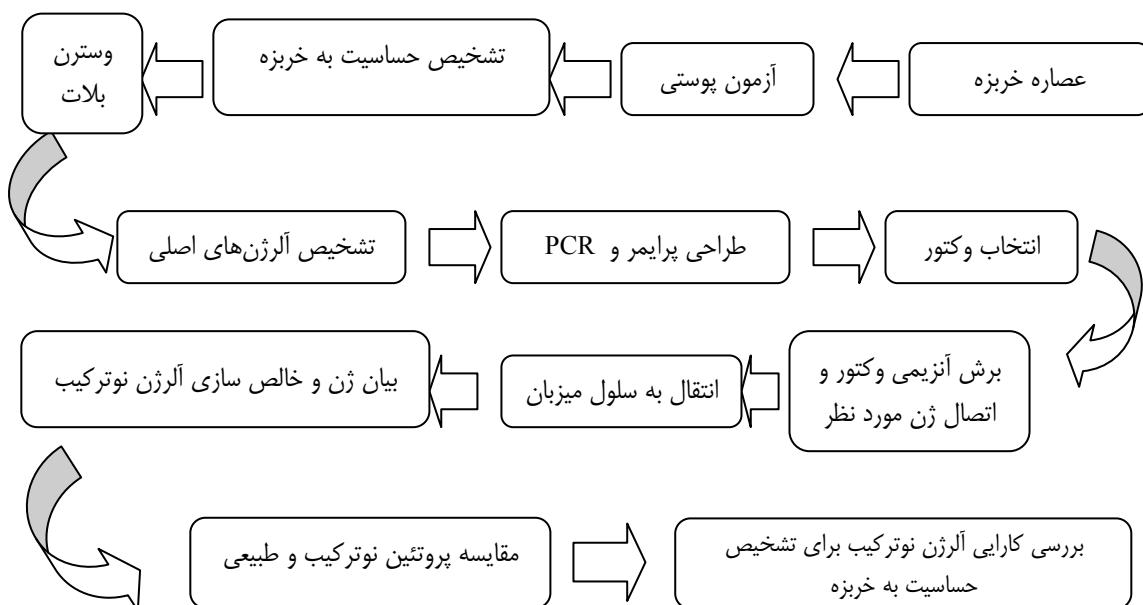
در برخی از موارد ایجاد واکنش متقاطع به دلیل حضور اپی‌توب‌های مشابه صورت می‌پذیرد. شکل ۴، مثالی از واکنش متقاطع (در سطح اپی‌توب) برای دو مولکول آلرژی‌ زا پروفیلین از میوه‌های خربزه و هندوانه می‌باشد. این دو مولکول در زنجیره خطی ساختمان اول خود دارای ۹۲٪ هومولوژی هستند و همان‌طور که نشان داده شده این دو مولکول از نظر ساختمان سوم پروتئینی بسیار شباهت دارند و در برخی قسمتها متفاوتند. حال اگر سیستم ایمنی علیه این قسمتها 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 قسمتها 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 آلرژی‌ زا مقایسه شده است؛ A ساختار سه‌بعدی مولکول پروفیلین و C، B و D مقایسه ساختمان سه بعدی مولکول پروفیلین خربزه، هندوانه و گوجه فرنگی نشان می‌دهد. بیشتر قسمتها مشترک سه مولکول B، C و D در قسمتها داخلي و قسمتهاي متفاوت در سطوح قابل دسترس قرار دارند (۲۷).

هرگاه بیماری به دلیل وجود واکنش متقاطع، هنگام آزمون نسبت به عصاره‌های تام چند ماده آلرژی‌ زای مختلف واکنش مثبت نشان دهد، این سوال مطرح می‌شود که

پرایمرهای اختصاصی و cDNA Tam 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 محدود الاثر، به طور جداگانه برش زده شدند؛ سپس محصول PCR توسط آنزیم لیگاز به داخل پلاسمید متصل شد. پلاسمید نوترکیب ایجاد شده وارد باکتری DH5- $\alpha$  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 افیتی کروماتوگرافی (NTA-Ni) خالص گردید. در نهایت آلرژنیسته پروتئین نوترکیب به روش RACE توالي کامل ژن آلرژیزا مورد نظر مشخص شد. در مرحله بعد با استفاده از توالي‌های بدست آمده، به منظور کلونینگ cDNA آلرژیزا در وکتور بیان‌کننده، پرایمرهای اختصاصی طراحی شد. توسط روش PCR و استفاده از ELISA Inhibition مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۶).

بیماران حساس به خربزه بر اساس علائم بالینی و آزمون پوستی گزینش شدند. آلرژی آنها به خربزه توسط روش الیزای IgE اختصاص (IgE-Specific ELISA) تایید شد. در آزمون وسترن بلاست با استفاده از سرم بیماران و عصاره Tam خربزه، یک پروتئین در محدوده ۱۴ کیلو Dalton دارای بیشترین واکنش با سرم بیماران بود. پس 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 توالي قسمتی از ژن پروتئین مورد نظر شدیم. پس از تعیین توالي قطعه نوکلئوتیدی فوق و استفاده از روش RACE توالي کامل ژن آلرژیزا مورد نظر مشخص شد. در مرحله بعد با استفاده از توالي‌های بدست آمده، به منظور مقایسه پروتئین نوترکیب و طبیعی از مراحل مختلف شناسایی، کلونینگ، تولید و تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی مولکول آلرژیزا خربزه (۳۱)



شکل ۶- خلاصه‌ای از مراحل مختلف شناسایی، کلونینگ، تولید و تعیین خصوصیات فیزیکوшیمیایی مولکول آلرژیزا خربزه (۳۱)

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 (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 مانند Der f 1 (یکی از آلرژی‌زاهای مایت خانگی) مقدار زیاد گلیکوزیلاسیون روی واکنش به IgE تأثیری ندارد (۳۲).

### حالیت

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

### 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 قرار گیرند که در ذیل اشاره مختصری به هر یک از آنها شده است.

### انتخاب سیستم بیان ژن و ایجاد DNA نوترکیب

برای تولید پروتئین آلرژی‌زا 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 آلرژی‌زا این پروتئین‌ها نقشی ندارد. در برخی موارد ژن مورد نظر (cDNA) مستقیماً داخل وکتور مناسب کلون می‌شود ولی در برخی موارد پروتئین‌های مختلفی (مثل پروتازها) 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 سیتوزولیک می‌باشد. مقدار زیادی پروتئین محلول در مورد برخی آلرژی‌زاهای ایجاد می‌شود. در برخی موارد هم پروتئین‌ها به صورت غیر محلول در اینکلوزن بادی‌ها (IB) قرار می‌گیرند. انتخاب سیستم‌های مختلف وکتور و میزبان می‌تواند روی سیر تولید پروتئین سیتوزولی محلول یا تشکیل IB 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 می‌گردد. پروتئین نوترکیب

گروههای غیرقطبی سطح بیومولکول‌ها و لیگاندهای هیدروفوبیک فاز ثابت می‌باشد.

IBها بیان می‌شوند (۳۲).

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 روشهای را با مقایسه نموده است.

### 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. مثال 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

### خصوصیات فیزیکوشیمیایی آلرژی‌زا

آلرژی‌زاهای خالص‌شده با روش‌های متعدد الکتروفورتیک SDS-PAGE قابل آنالیز هستند. Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis، یک روش آنالیتیکال مفید برای تجزیه و تحلیل خلوص پروتئین‌ها می‌باشد. پروتئین‌هایی که ساختار SDS به بعدی آنها با ترکیبات احیاکننده شکسته شده به 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 دایمراهی 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 ۴- 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	+	++++	++	+

نوترکیب به IgE اختصاصی ایجاد نماید (۴۲). با این حال آرژیزاها 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 برونکوپولموناری آسپرژیلوز آرژیک به وسیله آرژیزا ای نوترکیب بهتر از عصاره طبیعی است (۴۶).

با ایجاد مجموعه‌ای از آرژیزاها نوترکیب خالص استاندارد شده امکان تشخیص اختصاصی آرژی 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 آرژی بر اساس مولکول‌های آرژیزا، دورنمایی از ایجاد مخلوط چندین پروتئین نوترکیب اختصاصی برای هر بیمار جهت ایمونوتراپی فراهم می‌کند. پروتئین‌های آرژیزا ای 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 آرژیزاها نوترکیب به وسیله مطالعات بالینی انجام می‌شود (۴۸).

ساده‌ترین و کم‌خطیرین آزمایش برای بررسی آرژیزا یک آرژیزا ای نوترکیب، آزمون پوستی است. اولین آزمون پوستی آرژیزاها نوترکیب در سال ۱۹۹۲ انجام شد (۲۰) و اخیراً کارهای بیشتری در این زمینه انجام شده است.

همان‌طور که اشاره شد آرژیزاها زیادی از گرده گیاهان، مایتها، قارچ‌های مختلف، سم زنبور، کرفس و لاتکس توسط آزمون پوستی مورد ارزیابی قرار گرفته است (۴۹-۵۲). نتایج اولیه از تحقیق ما در مقایسه آرژیزا نوترکیب خوبه با نوع طبیعی آن نشان‌دهده قابلیت بالای آرژیزا ای نوترکیب در تشخیص بیماری آرژیک می‌باشد (۵۳،۵۴).

## آزمون پوستی توسط آرژیزاها نوترکیب ویژگی یک آرژیزا مهم‌ترین معیار برای تشخیص

## فعالیت بیولوژیک آرژیزا

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

## بی خطر بودن آرژیزاها نوترکیب

امکان آلدگی سلول میزانی که آرژیزاها نوترکیب در آن بیان می‌شود، باید مورد بررسی قرار گیرد. این آلدگیها می‌توانند اثرات پاتولوژیک داشته باشند. از نظر تئوری آلدگی 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 میزان گیاهی و یا جانوری بیان می‌شوند، ممکن است آلدگی به ویروس باشند. امکان آلدگی به عامل آنسفالوپتی حیوانات هم باید در نظر گرفته شود. بر همین اساس تا حد 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 سمیت، تعیین دوز و راه تجویز آرژیزاها نوترکیب ضروری به نظر می‌رسد (۴۰،۴۱).

## پتانسیل آرژیزاها نوترکیب برای تشخیص آرژی

اساسی‌ترین سؤال مطرح در مورد استفاده از آرژیزاها نوترکیب در تشخیص و درمان آرژی، 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 آرژیزاها

**بررسی فعالیت بازووفیل‌ها جهت تشخیص آلرژی**

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، تشخیص ازدیاد حساسیت نوع یک، عمدها بر اساس یافته‌های بالینی، آزمون پوستی و اندازه‌گیری IgE اختصاصی می‌باشد. با این حال تعیین IgE اختصاصی به خودی خود نتایج قطعی در ارتباط با پاسخ سلول‌های مؤثر (Effector Cell) به آلرژی‌زایی 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 آلرژی‌ Zahای مختلف بسته به ساختمان و وضعیت گلیکوزیل‌اسپیرون، 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، متتمرکز 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، بازووفیل 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 In vitro از آلرژی‌ Zahای طبیعی و نوترکیب در محیط انجام‌پذیر است و می‌توان از آن برای بررسی و اندازه‌گیری فعالیت بازووفیل‌ها در برخورد با آلرژی‌زا استفاده نمود (۵۷).

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

### آزمون آزادسازی هیستامین

با بهره‌گیری از آلرژی‌ Zahای نوترکیب امکان ترشح هیستامین از بازووفیل‌های پذیرنده IgE مشخص می‌شود.

اختصاصی آلرژی می‌باشد. تشخیص آلرژی توسط آلرژی‌ Zahای نوترکیب کاملاً اختصاصی است ولی ممکن است حساسیت‌های خفیف از نظر دور بماند. در مطالعات مختلف آلرژی‌ Zahای نوترکیب و عصاره‌های مواد آلرژی‌زا از نظر ایجاد علائم بالینی مقایسه شده‌اند (۵۵). آلرژی‌ Zahای نوترکیب برای آزمون پوستی ۱۰۰٪ اختصاصی هستند. با این حال حساسیت آزمون پوستی با آلرژی‌ Zahای 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 آلرژی‌ Zahای نوترکیب مختلف در یک مخلوط از آلرژی‌ Zahای 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، آلرژی‌ Zahای نوترکیب امکان تشخیص مطلوب آلرژی را فراهم می‌نمایند.

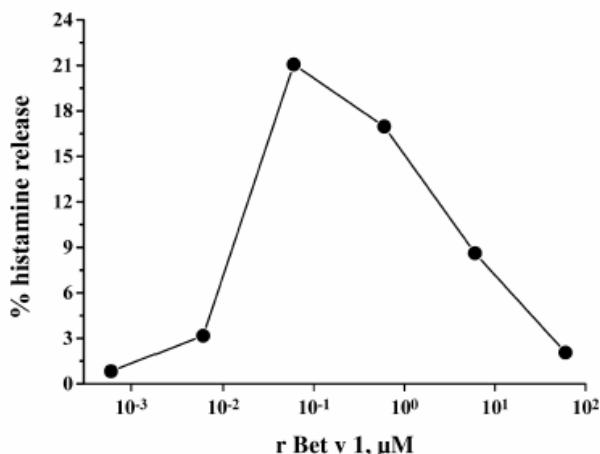
### استفاده از آلرژی‌ Zahای نوترکیب جهت تعیین IgE

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

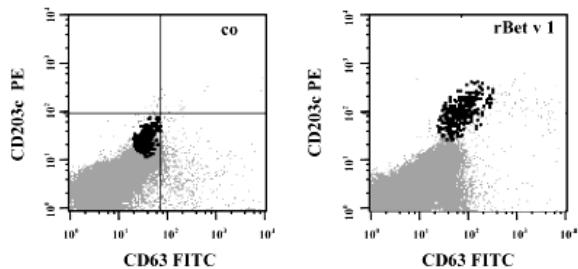
آلرژی‌ Zahای نوترکیب بسیاری به صورت تجاری در سیستم CAP شرکت فارماسیا در دسترس هستند. مطالعات نشان می‌دهد نتایج آزمونهای ایمونولوژیک CAP با نتایج آزمون‌های پوستی و داخل پوستی و ELISA هماهنگی دارد. در بسیاری از موارد از جمله آلرژی‌ Zahای نوترکیب قارچ آسپرژیلوس

(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).

آن به عنوان شاخصی برای تعیین بازوپلیل‌ها استفاده کرد. در برخورد با IgE مقدار این آنتیژن به سرعت افزایش می‌یابد؛ بنابراین در افراد حساس، برخورد با آلرژی‌زا یا آنتی IgE 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 نوتوکریب Bet v 1 نشان می‌دهد. آلرژی‌ Zahای طبیعی و نوتوکریب قادر به ایجاد افزایش بیان CD203c هستند؛ با این حال امروزه توصیه می‌شود که حتی الامکان از آلرژی‌ Zahای نوتوکریب استفاده شود (۵۹). افزایش میزان این آنزیم در سطح بازوپلیل‌ها در نمونه خون با استفاده از روش فلوسایتومتری قابل اندازه‌گیری است.



شکل ۷- آزادسازی هیستامین از بازوپلیل در مجاورت Bet v 1 نوتوکریب در یک فرد آلرژیک. بازوپلیل‌ها با غلظتهای مختلف rBet v 1 rانکوبه شده‌اند (۵۸).



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

هنگامی که گیرنده‌های IgE روی بازوپلیل‌ها با واسطه IgE (یا آنتی IgE 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 آلرژی‌ Zahای نوتوکریب قابل انجام است. امروزه توصیه می‌شود که در این آزمون حتی الامکان از آلرژی‌ Zahای نوتوکریب استفاده شود (۵۸).

### آزمون سنجش میزان CD63 سطح بازوپلیل

آنتی‌ژنی است که در سطح بسیاری از سلول‌های میلتوئیدی از جمله بازوپلیل‌ها و مونوسیت‌ها بیان می‌شود. مقدار این آنتی‌ژن در سطح بازوپلیل‌ها اندک می‌باشد ولی در صورت تماس با آلرژی‌زا یا آنتی IgE آنتی‌بادی بازوپلیل‌ها مقدار زیادی از این آنتی‌ژن را در سطح خود بروز می‌دهند. در سالهای اخیر این آنتی‌ژن در سطح بازوپلیل با روش‌های فلوسایتومتریک اندازه‌گیری می‌شود؛ بنابراین با بهره‌گیری از بیان CD63، CD203c، پاسخ بازوپلیل‌ها به آلرژی‌ Zahای نوتوکریب در افراد حساس قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

### آزمون اندازه‌گیری CD203c

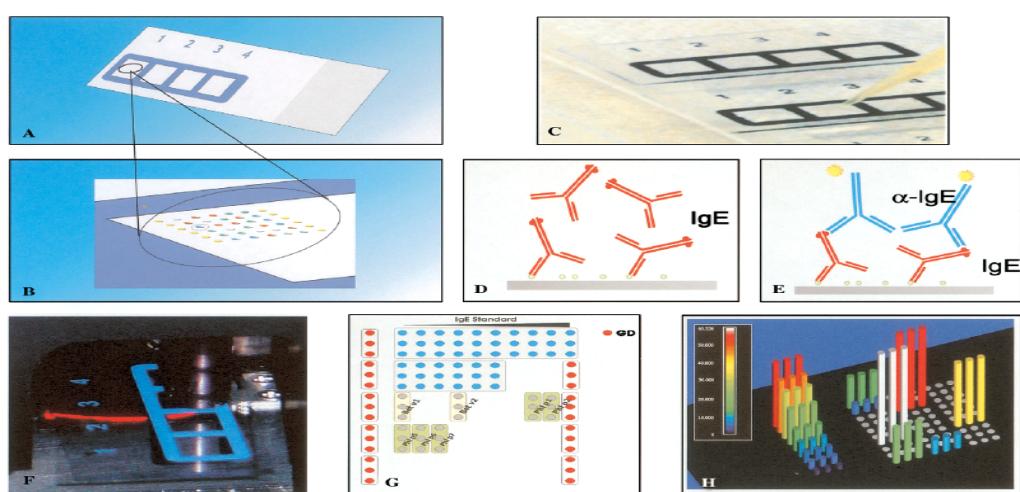
آنزیم اکتونوکلئوتید پیروفسفاتاز (ENPP-3,CD203c) فقط در سطح بازوپلیل‌های انسان بیان می‌شود و می‌توان از

بود (۱۸). مزیت این مخلوط آلرژی‌زا نوترکیب این است که هر آلرژی‌زا غلظت مشخصی دارد و عاری از هر گونه پروتئین غیر آلرژی‌زا، ماکرومولکول‌ها و یا آنزیم‌ها می‌باشد. از طرفی آلرژی‌ Zahای نوترکیب خطر وجود عوامل عفونی در عصاره‌هایی که از منابع حیوانی تهیه می‌شوند را برطرف می‌سازد.

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

### آلرژی‌ Zahای و ریزتراسه (Microarray)

پیشرفتهای چشمگیری در زمینه فناوری ریزتراسه (Microchip) انجام شده است (شکل ۹). از این فناوری جهت تشخیص سریع آلرژی استفاده می‌شود (۵۹). تعداد زیادی آلرژی‌زا نوترکیب (تا چندهزار عدد) روی این ریزتراسه‌ها متصل می‌شوند و در اثر مجاورت با سرم بیمار و واکنش IgE اختصاصی با آلرژی‌زا 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 (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 ریزتراسه‌ها جهت تشخیص اختصاصی آلرژی با استفاده از سرم بیمار (۶۱)

بازوویل‌های یک فرد حساس، به صورت جداگانه در مجاورت آلرژی‌زا نوترکیب 1 Bet v 1 و نمونه کنترل قرار گرفته است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان هر دو آنتی‌زن CD63 و CD203c هنگام مجاورت با آلرژی‌زا نوترکیب 1 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 آلرژی‌زا خاص مورد استفاده قرار گیرند.

### استفاده از مخلوطی از آلرژی‌ Zahای مختلف به منظور تشخیص آلرژی

همان‌طور که اشاره شد یکی از عمدۀ ترین مزایای آلرژی‌ Zahای نوترکیب خالص بودن این ترکیبات می‌باشد. این آلرژی‌ Zahای کاملاً اختصاصی هستند و در مقادیر مختلف قابل استاندارد کردن می‌باشند. بر خلاف عصاره‌های آلرژی‌زا طبیعی که از نظر مولکول‌های آلرژی‌زا متفاوت هستند، آلرژی‌ Zahای نوترکیب در مقایر کاملاً مشخص تولید می‌شوند؛ بنابراین کاملاً منطقی به نظر می‌رسد که یک مخلوط آلرژی‌زا مایت نوترکیب (یا آلرژی‌زا دیگر) تولید کنیم که غلظت آلرژی‌ Zahای آن مشخص می‌باشد. با دقت در انتخاب آلرژی‌زا و دقت در تعیین ترکیبات مخلوط آلرژی‌زا، این مخلوط از نظر آلرژی‌زا می‌باشد کاملاً مشابه نوع طبیعی خود خواهد

## 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 نوتروکیپ و امکان استفاده از فناوری ریزتراسه 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 آلرژی‌زاها بومی خود جهت استفاده از این فناوری دارند.

هر ریزتراسه شامل ۴ چاهک واکنش (برای چهار بیمار) می‌باشد که هر چاهک با تعداد زیادی آلرژی‌زای نوتروکیپ پوشیده شده است (A و B). هر چاهک ریزتراسه با ۲۰ میکرولیتر سرم بیمار انکوبه می‌شود تا IgE اختصاصی به آلرژی‌زای مربوطه متصل گردد (D و C). در مرحله بعد ردیابی IgE بیمار متصل شده 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).

## 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. *Clinical 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](http://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, Rodríguez R, Pauli G, Villalba M. Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fraxinell. *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, strategien und praktische Konsequenzen. 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](http://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 Dermatol.* 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 aspergillus fumigatus 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 Aspergillus 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, Fritzsche 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, Harwanegg 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<sup>1</sup>, M. Arefi<sup>2</sup>

### 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

<sup>1</sup> Corresponding Author; Associate Professor, Department of Immunology; Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. varastehmajid@hotmail.com

<sup>2</sup> Researcher; Department of Immunobiochemistry; Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.