

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA KEMIJU
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJE

Iva Pukleš

MOLEKULARNE METODE U KARAKTERIZACIJI ALERGENA

ZAVRŠNI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Osijek, 2017.

SAŽETAK

U današnjoj modernoj civilizaciji sve se češće javljaju alergije. Alergije obuhvaćaju određene reakcije ljudskog tijela na neke tvari što se opisuje kao preosjetljivost organizma (preosjetljivost tipa I) na neke tvari. Kada je organizam preosjetljiv na neku tvar, on ju prepoznaje kao antigen i počinje stvarati odgovarajuća antitijela. Takve se tvari, koje organizam prepoznaje kao antigene, nazivaju alergenima. Tek se početkom 20. stoljeća javljaju prvi pokušaji razumijevanja alergijskih bolesti kada su se pripravljali ekstrakti alergena u dijagnostičke i terapijske svrhe. U ovom završnom radu istraženo je djelovanje alergena u organizmu te su opisane molekularne metode koje se koriste u karakterizaciji alergena pregledom novije znanstvene literature.

Ključne riječi: alergije, alergeni, preosjetljivost, antigen, antitijelo, molekularne metode

ABSTRACT

In today's modern civilization, allergies have become the most common thing. Allergies are certain reactions of the human body to some substances which can be also described as hypersensitivity of the organism (Type I allergy) to some substances. When the organism is too sensitive to a substance, it recognizes a substance as an antigen and starts producing corresponding antibodies. These substances, recognized as antigens, are called allergens. It wasn't until the beginning of the 20th century when the first attempts of understanding allergic diseases have been developed where allergen extracts have been developed for diagnostic and therapeutic purposes. In this thesis activity of allergens in the human organism and molecular methods in characterization of allergens will be described and explored by the means of new scientific papers.

Key words: allergies, allergens, hypersensitivity, antigen, antibody, molecular methods

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	5
2. LITERATURNI PREGLED.....	6
2.1.DEFINICIJA ALERGENA.....	6
2.2.VRSTE ALERGENA.....	6
2.3.DJELOVANJE ALERGENA U ORGANIZMU.....	6
2.4.MOLEKULARNE METODE U KARAKTERIZACIJI ALERGENA.....	9
2.4.1. Rekombinantna tehnologija.....	10
2.4.2. CRD dijagnostika.....	11
2.4.3. CCD određivači.....	12
2.4.4. Mikročipovi.....	13
2.4.5. LC-MALDI-ToF/ToF-MS i LC-ESI-QToF-MS.....	15
2.4.6. IACE-MALDI MS.....	16
2.4.7. Ostale molekularne metode.....	18
3. ZAKLJUČAK.....	20
4. POPIS LITERATURE.....	21

1. UVOD

Alergijske su reakcije jako važan zdravstveni problem koji pogađa više od 25% populacije u razvijenijim zemljama. Danas su poznate alergije na životinjske proizvode, hranu, lijekove, ubode kukaca, spore plijesni, biljni polen, drvo, lateks različite kemijske spojeve i slično. S obzirom na vrstu alergena, alergijske se reakcije mogu javljati sezonski ili tijekom cijele godine. Kako se tek početkom 20. stoljeća javljaju prvi pokušaji istraživanja i razumijevanja alergija u dijagnostičke i terapijske svrhe, pripremaju se prvi ekstrakti alergena. Takvi su ekstrakti bili prirodnog podrijetla, te su bili heterogena smjesa proteina, glikoproteina i polisaharida što je onemogućavalo standardizaciju alergena iz odgovarajućih alergenskih uzoraka. Do danas su se znanstvenici bavili pronalaženjem najboljeg načina za izolaciju odgovarajućih alergena kako bi se oni mogli okarakterizirati [1.].

Vrlo je teško naći odgovarajuću metodu kojom bi se mogli okarakterizirati alergeni, njihova svojstva, struktura i mehanizmi djelovanja. Prvo su razvijene metode sa sirovim alergenskim ekstraktima koje su u pravilu samo dokazivale postoji li alergijska reakcija na određenu tvar. No, alergenski ekstrakti su smjesa tvari, pa je potrebno odrediti koja točno tvar iz te smjese razvija alergijsku reakciju. Zatim se počela raditi ekstrakcija tvari iz sirovog alergenskog pripravka kako bi se odredile komponente na koje je pacijent osjetljiv. Tako se razvila dijagnostika koja se koristi razdvajanjem alergena na komponente (*eng. Component resolved diagnostics, CRD*) [2.]. Kasnije, da bi se olakšala identifikacija i mehanizam djelovanja počeli su se koristiti rekombinantni alergeni [3.]. U radu je opisana metoda na mikročipovima te dvije analitičke metodologije: Imunoafinitetna kapilarna elektroforeza i masena spektrometrija s matricom potpomognutom laserskom desorpcijom/ionizacijom (*eng. Immunoaffinity capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, IACE-MALDI-MS*) te kombinacija metoda kao što su tekućinska kromatografija-elektoraspršna ionizacija-masena spektrometrija (*eng. Liquid chromatography – Electrospray ionization – Quadrupole time of flight – Mass spectrometry, LC-MALDI-ToF/ToF-MS i LC-ESI-QToF-MS*). Ove će metodologije biti detaljnije objašnjene nadalje u radu.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. DEFINICIJA ALERGENA

Alergen je tvar koju nakon unošenja u organizam tijelo prepoznaje kao stranu te potječe mehanizam obrane od nje. Drugim riječima, alergen je antigen. Antigen izaziva vrlo snažnu imunološku reakciju u kojoj se imunološki sustav bori protiv opažene „prijetnje“ koja bi inače bila bezopasna da ju organizam nije prepoznao kao stranu. Takve se imunološke reakcije nazivaju alergijama [4.].

Tehnički rečeno, alergen je antigen sposoban izazvati hipersenzitivnost tipa I kroz odgovor imunoglobulina E (IgE). Kod mnogih ljudi razina ovog imunoglobulina je velika kada se organizam brani od parazitskih infekcija. No, mnogi ljudi imaju ovakvu reakciju u dodiru s uobičajenim antigenima iz okoliša [4.].

2.2. VRSTE ALERGENA

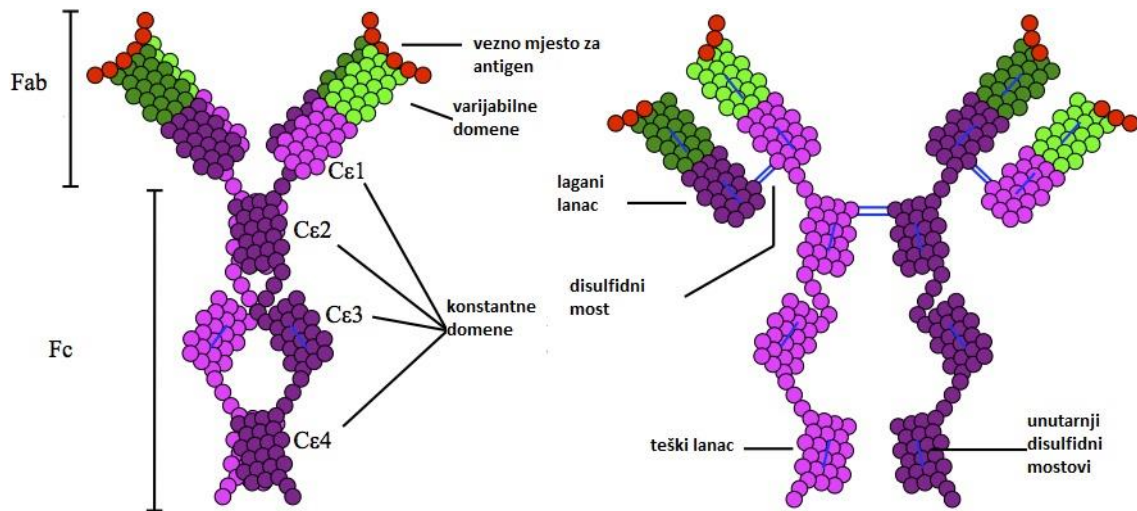
Alergeni se mogu podijeliti u više skupina a to su

- Alergeni životinjskog podrijetla (krzno, dlaka, žalci kukaca, vuna, itd)
- Biljni polen
- Plijesan
- Alergeni u lijekovima (penicilin, salicilati, itd.)
- Alergeni u hrani (mlijeko, morski plodovi, žitarice, itd)
- Metali (nikal, krom, kadmij, itd)
- Ostali alergen (lateks, drvo, itd) [5.]

2.3. DJELOVANJE ALERGENA U ORGANIZMU

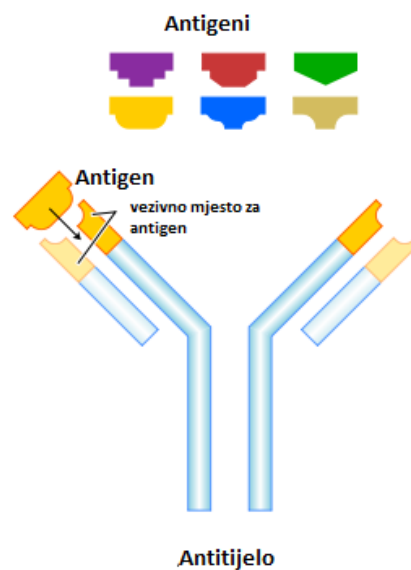
Imunoglobulin E koji stvara određeni odgovor u dodiru s alergenom zapravo je vrsta antitijela prisutna u sisavcima. Njegova se sinteza odvija u plazma stanicama prisutnima u limfnim čvorovima. Struktura IgE prikazana je na slici 1. IgE se sastoji od dva teška lanca i dva lagana lanca. Jedan lagani lanac sadrži jednu konstantnu i jednu varijabilnu domenu, dok jedan teški lanac sadrži tri konstantne domene i jednu varijabilnu. Lanci su međusobno povezani

kovalentnim disulfidnim mostovima. Varijabilne domene teškog i laganog lanca grade vezivno mjesto za antigen [6.].



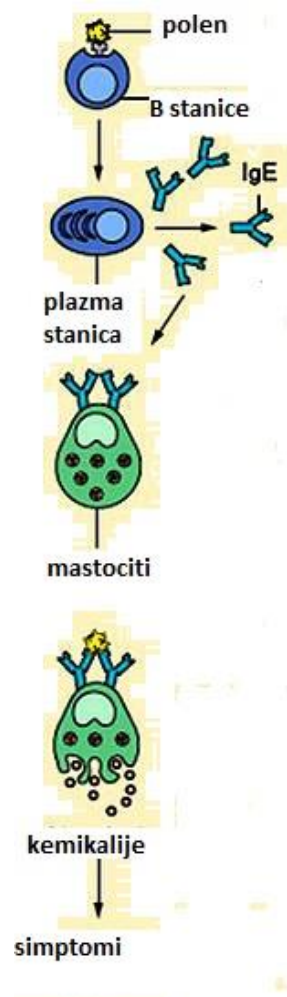
Slika 1. *Struktura IgE*

Antigen se veže za antitijelo (u ovom slučaju alergen za IgE) po principu ključ-brava (slika 2). IgE ne prepoznaje cjelokupnu strukturu alergena nego jedan karakteristični dio koji se zove epitop. Zbog toga IgE daje odgovor na različite vrste alergena budući da oni imaju isti karakteristični epitop. Vezivno mjesto za antigen na antitijelu zove se pacifratop [6.].



Slika 2. *Vežanje antigena za antitijelo po principu ključ-brava*

Postoje različiti mehanizmi djelovanja kroz koje antitijela djeluju nakon što se na njih veže antigen, a to su neutralizacija antigena, označavanje za uništenje vezanjem na površinu antigena te aktiviranje komplementarnog kompleksa [6]. Ono što se događa u organizmu osobe kada dođe u dodir s alergenom na koji razvija alergijsku reakciju prikazano je shematski na slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz djelovanja alergena u organizmu

U kontaktu s alergenom (npr. polen), osoba razvija veliku količinu IgE antitijela. Ova se antitijela vežu na mastocite. Ovdje još ne dolazi do alergijske reakcije. Alergijska reakcija nastupa idućim kontaktom osobe s alergenom kada kompleks IgE i mastocita počinje lučiti moćne kemijske posrednike u svoj okoliš, kao što su histamin i citokini. Tada se javljaju uobičajeni simptomi alergijskih reakcija [6.].

Postoji manja koncentracija IgE u krvnom serumu koja neće izazvati imunološku reakciju, a sve više od toga izaziva reakciju organizma [4.].

2.4. MOLEKULARNE METODE U KARAKTERIZACIJI ALERGENA

Alergeni za dijagnostiku mogu biti izolirani iz prirodnih alergenskih izvora (prirodni pročišćeni alergen) ili napravljeni rekombinantnom DNA tehnologijom (rekombinantni alergen). Za alergijsku dijagnostiku najčešće su se koristili sirovi ekstrakti koji su bili smjesa i alergena i tvari koje nisu alergeni. Zbog toga se razvila molekularna alergijska dijagnostika (MA), te je danas komercijalno dostupno oko 130 molekula alergena za testiranja prisutnosti specifičnih alergeničkih antitijela [7.].

Gotovo svaka tvar koja sadrži proteine potencijalni je alergen. Svaki alergenski izvor sadrži puno različitih alergenskih proteina (alergenske komponente). Svaka alergenska komponenta uglavnom ima nekoliko različitih epitopa (trodimenzionalno vezno mjesto koje se veže za antitijelo). Alergeni su osjetljivi na kiseli pH te zbog toga ne mogu proći želučanu barijeru. Također su osjetljivi na visoke temperature te gube svoja svojstva nakon prokuhavanja. Oni alergeni koji su stabilni u kiselim uvjetima i pri visokim temperaturama uglavnom izazivaju ozbiljne alergijske reakcije dok ostali uglavnom izazivaju blage lokalne simptome [7.].

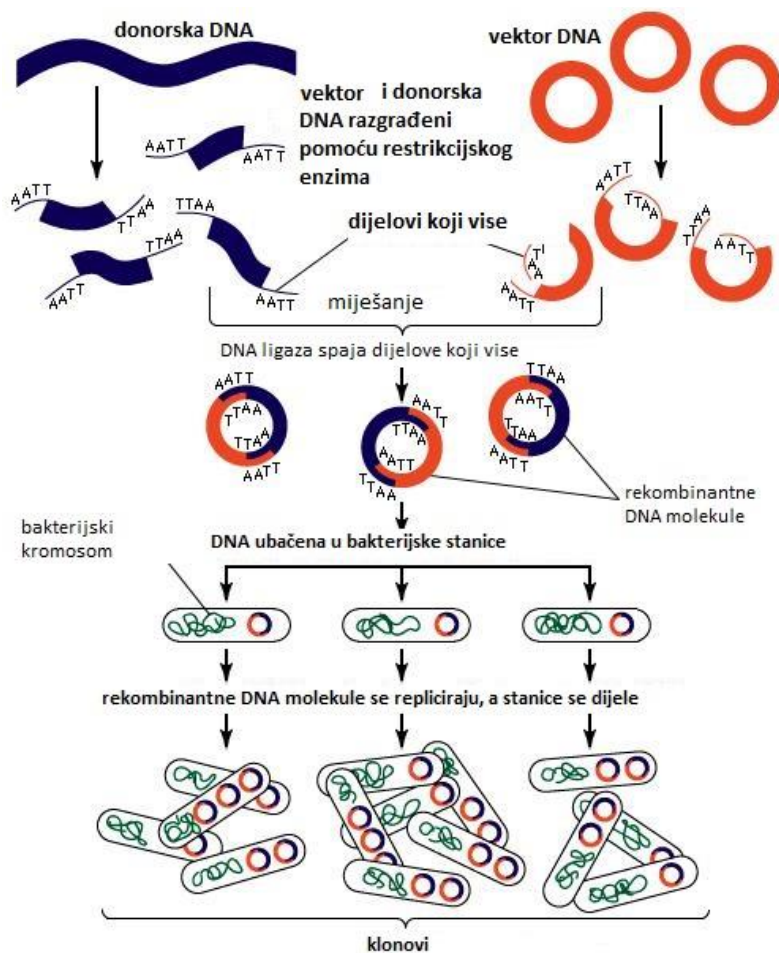
Alergen koji izaziva alergijske reakcije (primarni alergen), može imati sličnu strukturu nekom drugom proteinu (sekundarni alergen) zbog čega i taj protein također može uzrokovati alergijske reakcije. Ta pojava se naziva „ukrštena reakcija (eng. cross-reactivity)“, a do nje dolazi kada IgE antitijelo prepoznaje, veže i uzrokuje imunsku reakciju na slične molekule alergena (homologe) prisutne u drukčijim vrstama. Ova se reakcija uglavnom odvija među alergenima iz blisko povezanih vrsta ili dobro očuvanih molekula sa sličnom funkcijom prisutnih u mnoštvu različitih vrsta koje pripadaju istoj proteinskoj obitelji [8.].

Ko-senzitivnost je pojava kada je osoba izvorno osjetljiva na više od jednog alergenskog izvora (npr. na timijan i brezu). Ova pojava nije posljedica ukrštena reakcije nego se osjetljivost na jedan alergenski izvor javlja neovisno o drugom [9.].

Prisutnost specifičnih alergenskih antitijela (sIgE senzitivnost) daje određenu reakciju tijela u dodiru sa specifičnim alergenima. Kada se senzibilizacija javlja u dodiru samo s jednim alergenskih izvorom ili blisko povezanom skupinom alergenskih izvora, takva se senzibilizacija naziva monosenzitivnost. Polisenzitivnost (ili multisenzitivnost) javlja se ukoliko je osoba osjetljiva na tri ili više alergenskih izvora. Kako bi se okarakterizirala sIgE senzibilizacija razvijene su metode detekcije temeljene na alergneskim ekstraktima, a kasnije i alergenskim molekulama [10].

2.4.1. Rekombinantna tehnologija

Rekombinantna DNA tehnologija temelji se na pridruživanju lanaca DNA molekula koje potječu od dvije različite vrste i njihovom umetanju u organizam domaćina kako bi se proizvele nove genetske kombinacije [3.]. Na slici 4 prikazan je općeniti mehanizam rekombinantne tehnologije.



Slika 4. Mehanizam rekombinantne DNA tehnologije

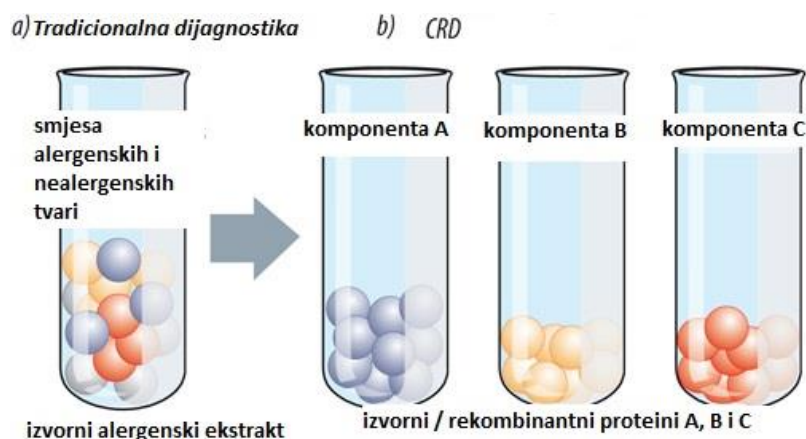
U ovom slučaju vektor je DNA molekula koja služi kao nosač kojim se strani genetički materijal unosi u drugu stanicu (u ovom slučaju bakterijsku). Vektorska i donorska molekula se razgrađuju pomoću restrikcijskog enzima. Pritom se krajnji dijelovi obje DNA spajaju pomoću DNA ligaze. Tako spojene DNA molekule nazivaju se rekombinantnim DNA molekulama. One se unose u bakterijske stanice gdje se repliciraju, dok se bakterijske stanice nakon replikacije DNA dijele pri čemu nastaju klonovi [3.].

Rekombinantna tehnologija, u polju alergologije, dovela je do brojnih napredaka u karakterizaciji alergena i razvoju cjepiva, kao i do saznanja o imunološkim mehanizmima koji se odvijaju kao posljedica alergijskih bolesti. Rekombinantni alergeni mogu se koristiti za poboljšanu dijagnozu alergije i za određivanje senzibilizacijskog profila pacijenta što je i preduvjet za odabir odgovarajuće imunoterapije.

2.4.2. CRD dijagnostika

CRD dijagnostika (eng. *Component resolved diagnostics*) koristi pročišćene izvorne alergene ili rekombinantne alergene za detekciju specifične IgE senzibilizacije na individualne alergenske molekule [2.].

CRD je nova metodologija koja omogućava identifikaciju specifičnih kliničkih fenotipa. CRD može identificirati specifične komponente ukrštenih reakcija sličnih alergena (homologa) koji potječu iz različitih alergenskih izvora. Istovremeno može odrediti vezanje IgE na više različitih alergena koristeći minimalne količine seruma (20-25 μ L) [2.]. Na slici 5 prikazana je razlika između tradicionalne i CRD dijagnostike.



Slika 5. Usporedba tradicionalne i CRD dijagnostike

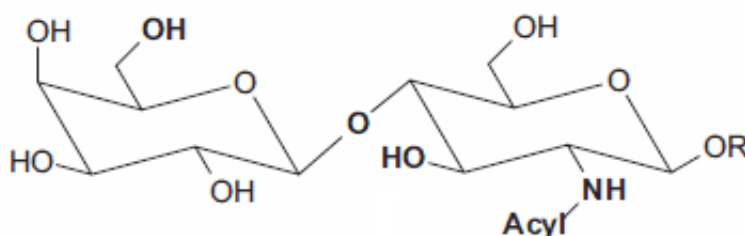
CRD dijagnostika proširila je mogućnost detaljnije karakterizacije alergijskih bolesti. Razdvajanjem alergenskog ekstrakta na komponente moguće je točno odrediti koja komponenta izaziva alergijsku reakciju te je tako moguće lakše analizirati mehanizme djelovanja i svojstva takvih alergena [2.].

2.4.3. CCD određivači

CCD (eng. *Cross-reactive carbohydrate determinants*) su ugljikohidratne strukture vezane za proteine koje su odgovorne za fenomen ukrštene reakcije (eng. *Cross-reactivity*). To je pojava kada određena alergenska komponenta zbog sličnosti u strukturi reagira s IgE antitijelom. Ovakve strukture predstavljaju smetnju u dijagnostici alergijskih reakcija budući da daju lažno pozitivne testove [11].

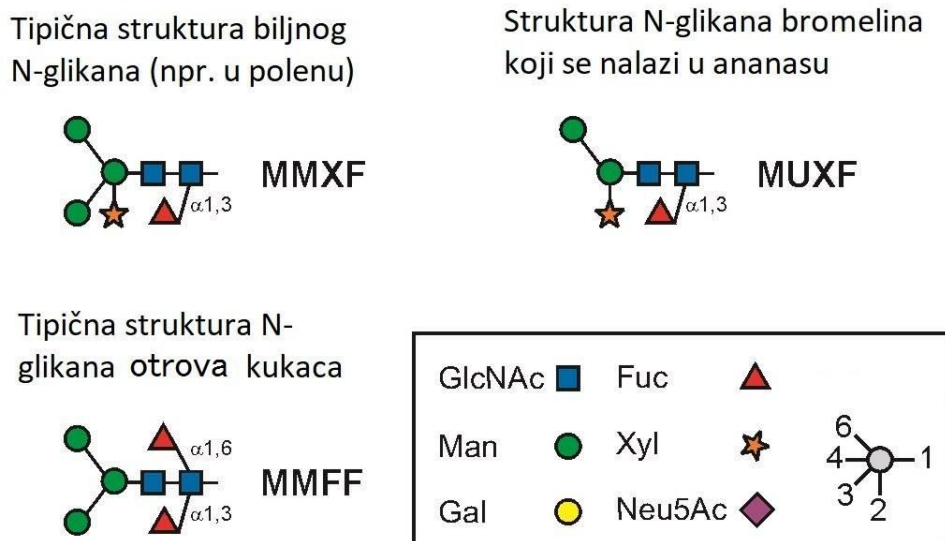
Godine 1981. na Sveučilištu u Amsterdamu Rob Aalberse primijetio je mnoštvo ukrštenih reakcija seruma nekih pacijenata na bilo koje biljke i kukce. Bilo je potrebno čak 10 godina za objašnjenje ovog fenomena. Tako su 1991. godine japanski istraživači odredili strukturu epitopa koji je zajednički peroksidazi ljutog hrena i neuronima muha roda *Drosophila*. Taj epitop je oligosaharid (N-glikan) koji sadrži ksilozu i vezan je na asparagin, a na jezgru je vezan α -1,3-fukozi ostatak. Ovakva strukturna obilježja nisu prisutna u ljudskim i životinjskim organizmima. Tada je utvrđeno da je α -1,3-fukoza važna za vezanje IgE antitijela pacijenata na alergen pčelinjeg otrova koji sadrži N-glikan sa strukturnim sličnostima biljnog N-glikana. Zbog toga se ona smatra najvažnijim strukturnim elementom koji je CCD u alergenima biljnog podrijetla i alergenima koji potječu od kukaca [11].

Struktura α -1,3-fukoze prikazana je na slici 6.



Slika 6. Struktura α -1,3-fukoze

Na slici 7 prikazani su primjeri ukršteno reaktivnih N-glikana biljaka i kukaca. Njihovo zajedničko obilježje je upravo α -1,3-fukoza.



Slika 7. Primjeri ukršteno reaktivnih N-glikana biljaka i kukaca

Zbog ove zajedničke karakteristike, testiranjem spomenutih alergena na humani serum, dobit će se pozitivni IgE odgovor. To znači da će se pokazati da je osoba alergična na polen istodobno alergična na otrov kukca koji ima isti CCD, budući da će se oba alergena vezati na IgE antitijelo. Tako se dobije lažno pozitivan test. Ovo otkriće je pokazalo da nije dovoljno dobiti pozitivan IgE odgovor kako bi se dijagnosticirala alergijska bolest. Potrebno je vršiti dodatna istraživanja kako bi se sa sigurnošću mogla uspostaviti dijagnoza te kako bi se izbjegli ovakvi lažno pozitivni testovi [11.].

2.4.4. Mikročipovi

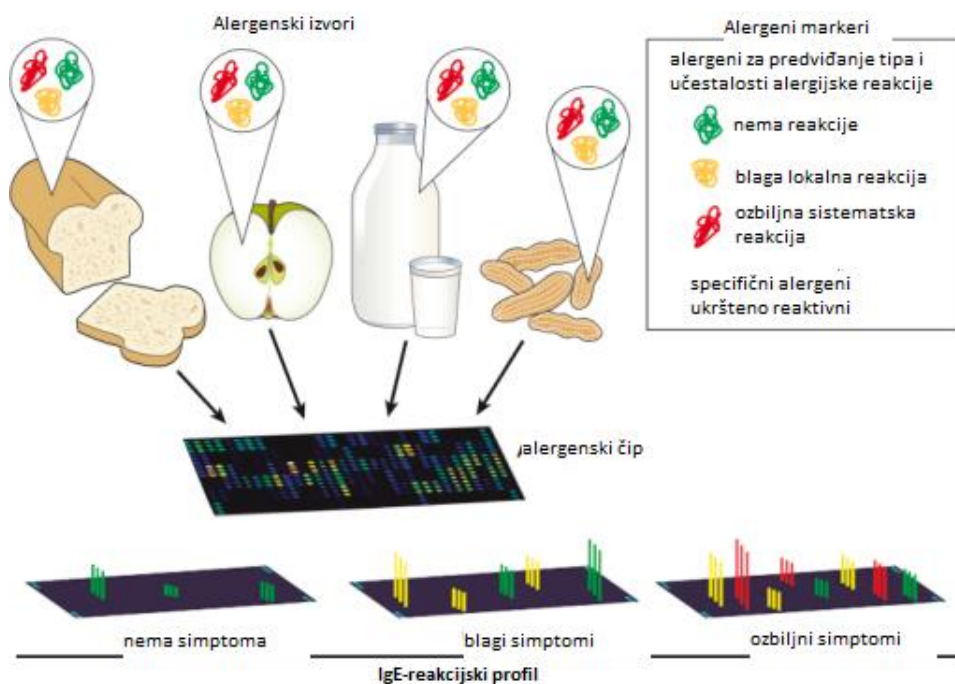
Tijekom godina značajna tehnološka otkrića dovela su do uporabe:

- a) Neizotopnih poli- i monoklonskih humanih IgE Fc konjugata za detekciju vezanog IgE antitijela
- b) Referentnog IgE pripravka Svjetske zdravstvene organizacije (eng. *World Health Organization* – WHO)
- c) Novih čvrstih matrica s većim kapacitetom vezanja alergena
- d) Kompjuterski kontroliranih autoanalizatora

e) Proizvodnje pročišćenih rekombinantnih i izvornih alergenskih komponenti.

Pozitivni IgE odgovor znači da je individua osjetljiva na određeni alergen što je nužna, ali ne i dovoljna informacija za uspostavljanje konačne dijagnoze. Da bi se odgovor IgE antitijela na prisutni alergen preveo u klinički alergijski simptom, potrebno je poznavati koncentraciju IgE antitijela, afinitet vezanja na specifični alergen, postotak specifičnog IgE u odnosu na ukupni IgE u serumu [12.].

Prvo istraživanje o primjeni tehnologije mikročipova na dijagnostiku humanih alergijskih bolesti objavljeno je 2002. godine. Hiller i sur. [13.] su imobilizirali 94 pročišćena rekombinantna i prirodna alergena u koncentraciji 0,3 mg/mL u 150 mM puferu natrijeva fosfata. Te su uzorke, u tri replikata, nanijeli na prethodno aktiviranu amino-reaktivnu premazanu staklenu pločicu koju su koristili kao čvrsti antigen za vezanje specifičnih antitijela. Primarno su istraživali vezanje na IgG i IgE iz 200 μ L humanog seruma razrijeđenog u omjeru 1:5 u početnoj inkubaciji. Nakon toga, talog su isprali puferom kako bi uklonili nevezane proteine. U sljedećem koraku vezani IgE detektiran je anti-humanim IgE antitijelom koji je bio označen fluoroforom. Nakon drugog ispiranja puferom vezani fluorofor je detektiran fluorescentnim mikročip čitačem i tako je dobiven IgE reakcijski profil nekog pojedinca [12.]. IgE reakcijski profili koji nastaju ovakvom vrstom dijagnostike prikazani su na slici 8.



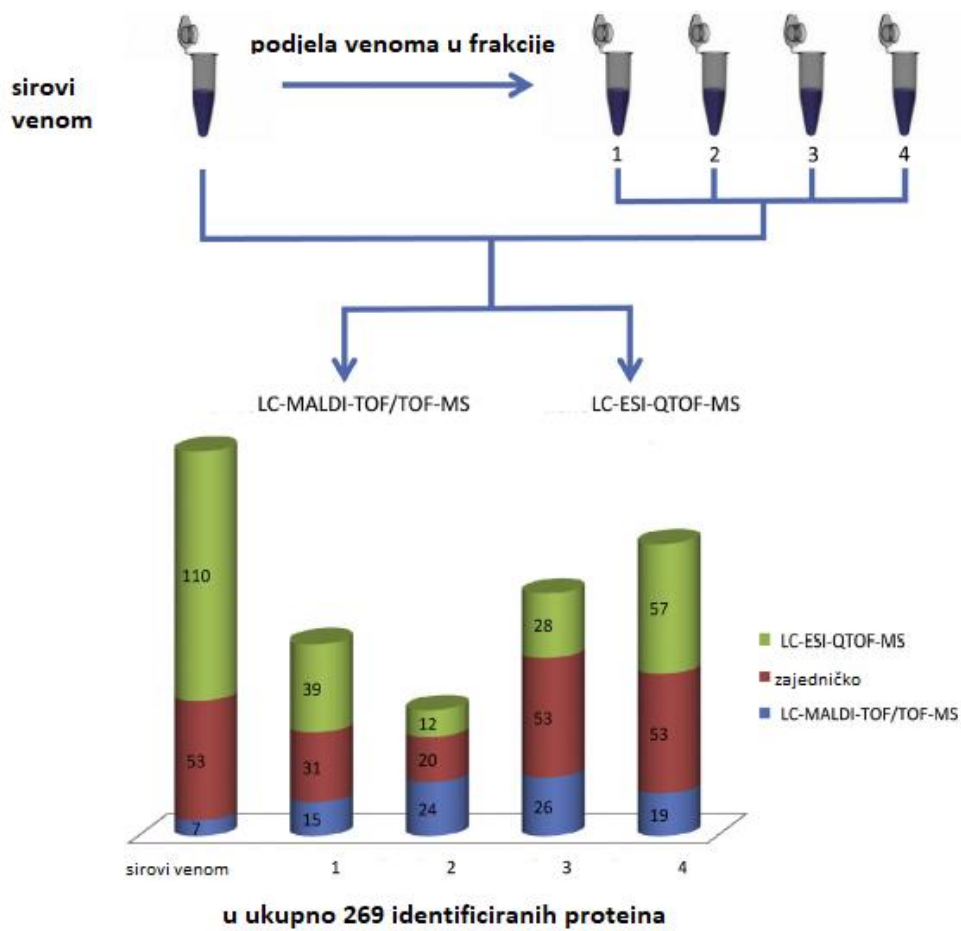
Slika 8. IgE reakcijski profili nastali dijagnostikom na mikročipu

2.4.5. LC-MALDI-ToF/ToF-MS i LC-ESI-QToF-MS

Matysiak i sur. [14.] su opisali metodu za karakterizaciju otrova medonosne pčele (lat. *Apis mellifera*) kombinirajući metode LC-MALDI-ToF/ToF-MS (eng. *Liquid chromatography – matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of flight / Time of flight – Mass spectrometry*) i LC-ESI-QToF-MS (eng. *Liquid chromatography – Electrospray ionization – Quadripole time of flight – Mass spectrometry*).

Životinjski otrovi sastoje se od proteina i peptida s potencijalnom medicinskom i biotehnološkom primjenom. Ugriz različitih životinja može biti smrtonosan po ljude, no otrov također može sadržavati komponente koje imaju terapijske vrijednosti [15.]. Otrovi medonosne pčele (eng. *Honeybee venom – HBV*) je podvrgnut različitim kliničkim studijama zbog mnoštva bioloških i farmakoloških svojstava koje posjeduje [16.]. HBV je kompleksna smjesa biogenih amina, šećera, fosfolipida, aminokiselina i feromona. Sve komponente kojih ima u izobilju u HBV-u određene su metodama tekućinske kromatografije i kapilarne elektroforeze s UV-VIS ili diodnim detektorima [17-22]. Maseni spektrometri koji su opremljeni s MALDI ili ESI ionskim izvorima nisu ograničeni samo na identifikaciju već poznatih komponenti. Već korištenjem baze podataka proteinskih sekvenci moguće je identificirati nepoznate proteine i peptide s potencijalnom biološkom aktivnošću [23].

Uzorci otrova medonosne pčele *Apis mellifera carnica* prikupljeni su tijekom stimulacije pčela električnom strujom u vremenu od 2 sata. Velika čistoća uzorka je potvrđena tekućinskom kromatografijom visoke razlučivosti (eng. *High performance liquid chromatography – HPLC*) te su određene većinske komponente koje čine otrov. Osušeni uzorci su čuvani u tami na 5 °C nakon čega su otopljeni u 50 mM otopini amonijevog hidrogenkarbonata s dodatkom 1 mL 3%-tnog acetonitrila. Uzorci su obrađeni ultrazvukom u vremenu od 10 min i centrifugirani 10 min. Nadalje, čista otopina je podvrgnuta tekućinskoj kromatografiji. Nakon toga uzorci su analizirani na MALDI-ToF/ToF-MS i ESI-QToF-MS/MS uređajima. Na slici 9 prikazana je shema ove metodologije [14].



Slika 9. LC-MALDI-ToF/ToF-MS i LC-ESI-QToF-MS analize otrova medonosne pčele

Nakon višestupanjskog ispiranja sirovog uzorka pčelinjeg otrova, uzorak je podijeljen u 4 različite frakcije. Ukupno je detektirano 269 proteina, u okviru toga 49 alergena i tvari koje sudjeluju u mehanizmima trovanja. Osim poznatih proteina, dodatnih 5 toksina je identificirano. Kombinacija MALDI i ESI ionizacije rezultirala je brojnim identifikacijama proteina koje ne bi bile moguće sa samo jednom tehnikom [14.].

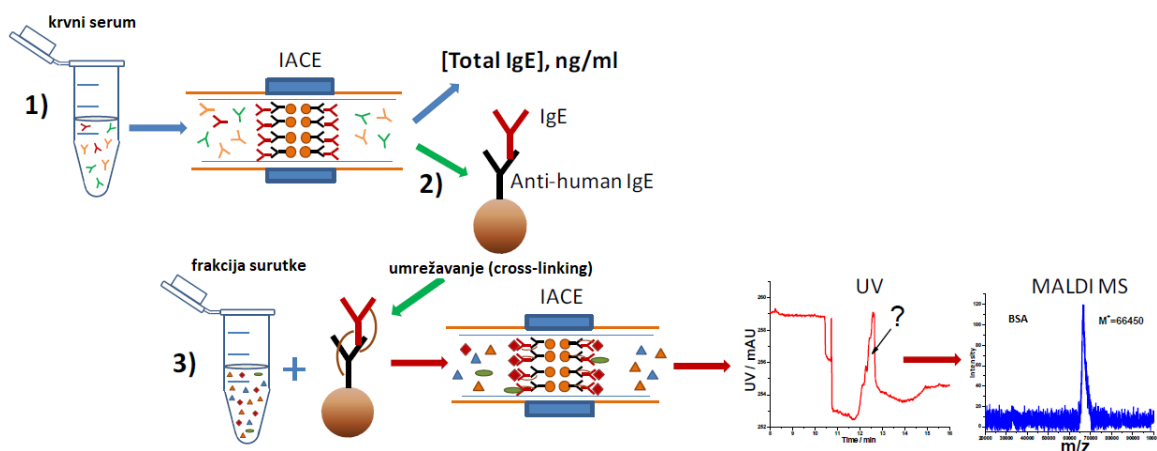
2.4.6. IACE-MALDI MS

IACE-MALDI MS (eng. *Immunoaffinity capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*) skraćeni je naziv za kombinaciju dvije analitičke tehnike: imunoafinitetne kapilarne elektroforeze i masene spektrometrije s matricom potpomognutom laserskom desorpcijom/ionizacijom [24.].

Prvo je provedena imunoafinitetna kapilarna elektroforeza (IACE). Pripravljena je otopina anti-humanih IgE molekula obilježenih fluoroforom koja se pomiješala s uzorkom koji se želi testirati te se smjesa razdvajala kapilarnom elektroforezom. Anti-humane IgE molekule su se vezale s ciljnim molekulama. U kapilarnoj elektroforezi razdvajanje se vrši na temelju mase. Princip iza imunoafinitetne kapilarne elektroforeze je u tome što se mijenja mobilnost ciljnih molekula zbog intermolekulskih interakcija s anti-humanim IgE molekulama. Tako je moguće izdvojiti ciljne molekule. No, kada se smjesa razdvoji na komponente potrebno je kvalitativno i kvantitativno odrediti željeni sastojak. Kao detektori za kapilarnu elektroforezu često se koriste UV/VIS spektroskopija, fluorescentni detektori te masena spektrometrija [24.].

MALDI je ionizacijska tehnika koja koristi matricu koja može apsorbirati lasersku energiju za stvaranje iona iz velikih molekula s minimalnom fragmentacijom. Koristi se za analizu biomolekula (biopolimera kao što su DNA, proteini, peptidi, saharidi) i velikih organskih molekula (polimera, dendrimera i ostalih makromolekula). Te su molekule osjetljive i podložne fragmentaciji kada se ioniziraju (protoniraju ili deprotoniraju) te je ova tehnika razvijena upravo kako bi se minimalizirala fragmentacija tijekom ionizacije. MALDI MS je vrsta masene spektrometrije koja se koristi za analizu ovakvih molekula i to kao detektor nakon imunoafinitetne kapilarne elektroforeze [24.].

Gasilova i sur. [24.] su 2014. godine vršili CRD dijagnostiku alergije na kravlje mlijeko pomoću IACE-MALDI MS metode. Shema ove analize prikazana je na slici 9.



Slika 10. Shema IACE-UV-MALDI MS metode

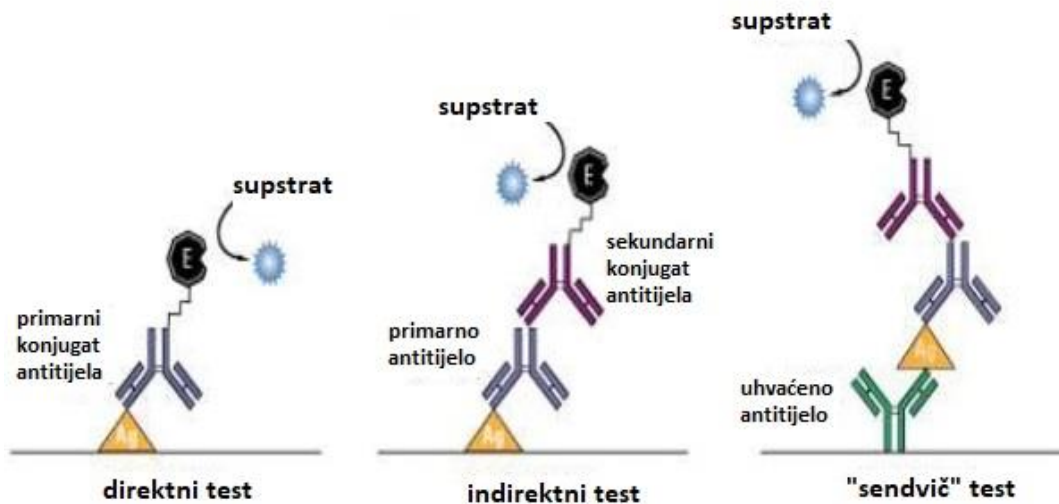
Ukupni IgE pacijenta alergičnog na kravlje mlijeko određen je IACE-UV tehnikom. Ova tehnika razvijena je pomoću magnetnih kuglica (eng. *Magnetic beads* – MBs) na koje je nanesen sloj anti-humanih IgE antitijela (eng. *Antibody* – Abs) kako bi se odredila općenita alergijska dijagnoza. Potom su, imunokompleksi anti-humanog IgE s IgE antitijelom iz krvnog seruma pacijenta kemijski umreženi (eng. *Cross-linked*) na površinu magnetskih zrna. Ovako pripravljena imunopotpora se koristila za vezanje ekstrahiranih, individualnih alergena iz mlijeka kako bi se, putem IACE analize s UV i MALDI MS detekcijom, identificirali proteini koji su odgovorni za alergije. Nakon toga, CRD dijagnostika je provedena izravno s frakcijama mlijeka (npr. surutka). Otkriveno je da su se s ekstrahiranim IgE antitijelom vezali albumin goveđeg seruma (eng. *Bovine serum albumin* – BSA), laktoferin i α -kazein što upućuje da je pacijent alergičan na ove proteine iz kravljeg mlijeka. Za ovu analizu bilo je potrebno samo 2 μ L krvnog seruma što je dovoljno za odvijanje 25-30 IACE analiza tijekom jednog koraka identifikacije alergena [24.]. Budući da je analiza izvodljiva izravnom primjenom ekstrakata mlijeka, to je otvorilo mogućnost za karakterizaciju mase i strukture alergena. Također, ovom analitičkom metodom moguće je otkriti neuobičajene alergene što je vrlo korisno za preciznu alergijsku dijagnostiku te za otkrivanje fenomena ukrštenih reakcija kako bi se izbjegli lažno pozitivni testovi.

Budući da je nedovoljna informacija o alergijskoj reakciji samo pozitivan IgE odgovor na neki alergen, ova metoda pruža dodatne informacije kao što su vrsta alergena, informacije o afinitetu vezanja, kvantifikacija, te pruža mogućnost stvaranja imunoeseja [24.].

2.4.7. Ostale molekularne metode

Da bi se poboljšala kvaliteta ekstrakta alergena i dosljednost tijekom serija izvođenja analiza, Svjetska zdravstvena organizacija je još u 80-im godinama 20. stoljeća razvila referentne standarde za 5 alergenskih pripravaka. Međutim, Administracija SAD-a za hranu i lijekove (FDA, eng. *United States Food and Drugs Administration*) do sada je standardizirala 19 alergenskih ekstrakata koji uključuju 9 ekstrakata polena, 6 ekstrakata otrova, 2 ekstrakta gnjjida i 2 mačja epidermalna ekstrakta pomoću ELISA imunoeseja. ELISA (eng. *Enzyme-linked immunosorbent assay*) je enzimsko vezani imunoapsorbirajući esej [1.]. To je imunopretraga visoke osjetljivosti i selektivnosti za kvalitativno i kvantitativno određivanje specifičnih molekula analita, npr. ukupnog IgE. Ova tehnika je pogodna za određivanje vrlo

niskih koncentracija analita (do ng/kg), a priprema uzoraka je jednostavna i moguće je istovremeno ispitati veliki broj uzoraka. ELISA tehnika se provodi na standardnim mikrotitarskim pločicama s velikim brojem jažica [25.]. Postoje tri osnovna tipa ELISA testova, a to su direktni, indirektni i „sendvič“ test koji su prikazani na slici 10.



Slika 11. Tipovi ELISA testova

ELISA testovi se mogu temeljiti na kompetitivnoj ili inhibicijskoj tehnici. Osim komercijalno dostupnih mikročipova te ELISA testova, također se koriste površinska plazmonska rezonancija (eng. *Surface plasmon resonance* – SPR) i elektrokemijski imunosenzori, magnetoforetski imunoeseji, interferometrijski refleksijski senzori koji stvaraju slike (eng. *Interferometric reflectance imaging sensors*), elektroforeza afinitetnom sondom (eng. *Affinity probe electrophoresis*). Ove se metode koriste za detekciju ukupnog i specifičnog IgE antitijela no njihov je nedostatak što koriste pročišćene rekombinantne alergene sa standardne liste za usporedbu. Takvi standardi su definirani za svaki tip alergije na hranu [1.]. No, neočekivane i rijetke alergene nije moguće okarakterizirati ovim tehnikama, oni se zanemaruju te se tako smanjuje preciznost u dijagnostici alergijskih bolesti.

3. ZAKLJUČAK

U današnje vrijeme razvio se veliki broj specifičnih alergijskih bolesti. U prošlosti su se radili neprecizni alergijski testovi kako bi se dala pravilna dijagnoza. No, kasnijim napretkom tehnologije i vršenjem različitih istraživanja utvrđeno je da je dijagnostika alergijske bolesti vrlo kompleksan i osjetljiv proces zbog čega je potrebno vršiti detaljne analize. Nije dovoljno dobiti pozitivan IgE odgovor na određeni alergen jer postoji fenomen ukrštene reakcije koji je zaslužan za lažno pozitivan test. Tako su razvijene molekularne metode koje će biti brze, jednostavne i dati dodatne informacije. Prvo su razvijeni standardi alergenskih ekstrakata koji su služili za uspostavljanje dijagnoze, no ovakvom dijagnostikom zanemareni su neočekivani i rijetki alergeni. Pregledom literature utvrđeno je da se najboljom tehnikom pokazala IACE-MALDI MS tehnika koja se primjenjuje za identifikaciju, kvantifikaciju, istraživanja o afinitetu vezanja te za stvaranje imunoeseja kod alergena prisutnih u hrani. Za identifikaciju alergena u životinjskim otrovima najboljima se pokazala kombinacija dviju tehnika: LC-MALDI-ToF/ToF-MS i LC-ESI-QToF-MS. Također dodatne informacije pri dijagnostici alergijske bolesti omogućuju preciznije određivanje terapije pri liječenju ovih bolesti.

4. POPIS LITERATURE

1. F. Ferreira, M. Wolf, M. Walner, Molecular Approach to Allergy Diagnosis and Therapy, *Yonsei Med. J.* **55** (2014), 839-852
2. R. Treudler, J. C. Simon, Overview of Component Resolved Diagnostics, *Curr. Allergy Asthma Rep.* **13** (2013), 110-117
3. <https://www.britannica.com/science/recombinant-DNA-technology> (12.06.2017.)
4. <https://www.aaaai.org/conditions-and-treatments/conditions-dictionary/allergen> (12.06.2017.)
5. <https://www.foodallergy.org/common-allergens> (14.06.2017.)
6. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry, W. H. Freeman & Co., New York, 2002.
7. J. Kleine-Tebbe, T. Jakob, Molecular Allergy Diagnostics, Springer International Publishing, Berlin, 2017.
8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2396/> (20.06.2017.)
9. <https://www.healthy-house.co.uk/allergy-information/multiple-chemical-sensitivity-mcs-information> (21.06.2017.)
10. <https://www.allergy-clinic.co.uk/allergies/introduction-to-allergy/chemical-sensitivity/> (21.06.2017.)
11. S. Vrtala, From allergen genes to new forms of allergy diagnosis and treatment, *Allergy* **63** (2008), 299-309
12. R. G. Hamilton, Microarray Technology Applied to Human Allergic Disease, *Microarrays* **6** (2017), 350-356
13. R. Hiller, S. Laffer, C. Harwanegg, M. Huber, M. et al., Microarrayed allergen molecules: Diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J.* **16** (2002), 414-416
14. J. Matysiak, J. Hajduk, F. Mayer, R. Hebel, Z. J. Kokot, Hyphenated LC-MALDI-ToF/ToF and LC-ESI-QToF approach in proteomic characterization of honeybee venom, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **121** (2016), 69-76
15. D.C. de Graaf, M. Aerts, E. Danneels, B. Devreese, Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy, *J.Proteomics* **72** (2009) 145–154
16. J.J. Calvete, P. Juarez, L. Sanz, Snake venomics. Strategy and applications, *J.Mass Spectrom.* **42** (2007) 1405–1414

17. Z.J. Kokot, J. Matysiak, Simultaneous determination of major constituents of honeybee venom by LC–DAD, *Chromatographia* **69** (2009) 1401–1405
18. Z.J. Kokot, J. Matysiak, B. Urbaniak, P. Derezinski, New CZE–DAD method for honeybee venom analysis and standardization of the product, *Anal. Bioanal.Chem.* **399** (2011) 2487–2494
19. J. Matysiak, P. Derezinski, B. Urbaniak, A. Klupczynska, A. Zalewska, Z.J. Kokot, A new method for determination of hyaluronidase activity in biological samples using capillary zone electrophoresis, *Biomed. Chromatogr.* **27** (2013) 1070–1078
20. V. Pacakova, K. Stulik, P. Hau, J. Jelinek, I. Vins, D. Sykora, Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for determination of some bee venom components, *J. Chromatogr. A* **700** (1995) 187–193
21. V. Pacakova, K. Stulik, Validation of a method for determination of phospholipase A2 and melittin in bee venom preparations by capillary electrophoresis, *J. AOAC Int.* **83** (2000) 549–554
22. K. Rader, A. Wildfeuer, F. Wintersberger, P. Bossinger, H.W. Mucke, Characterization of bee venom and its main components by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* **408** (1987) 341–348
23. G.M. Weinstock, G.E. Robinson, R.A. Gibbs, K.C. Worley, J.D. Evans, R. Maleszka, et al., Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*, *Nature* **443** (2006) 931–949.
24. N. Gasilova N., H. H. Girault, Component-resolved diagnostic of cow's milk allergy by immunoaffinity capillary electrophoresis-matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* **86** (2014), 6337–6345
25. http://www.worldallergy.org/professional/allergic_diseases_center/allergen_standardization/ (24.06.2017.)