مجـلهی علمـی، پژوهشی دانشگاه علـوم پزشکی زنجـان
دورهی ۱۵، شمارهی ۵۹ ، تابستان ۱۳۸۶، صفحات ۵۵ تا ٦٤

مطالعهی اجزای آلرژیزای کلادوسپوریوم هرباروم با روش ایمونوبلاتینگ

دکتر محمدتقی هدایتی*، سعید کابلی**، دکتر زهره حاجحیدری ***، دکتر طاهره شکوهی****،
دکتر رضاعلی محمدپور*****

نویسندهی مسئول: ساری، دانشکدهی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران hedayaty2001@yahoo.co.uk

دریافت: ۸۵/۱۲/۲۸ پذیرش: ۸۶/۷/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: *مطالعات متعددی بر روی آنتیژنهای کلادوسپوریوم هرباروم (ک. هرباروم) نشان داده است که این آنتیژنها نقش مهمی در تولید IgE اختصاصی در افراد آتوپیک داشته و موجب بدتر شدن وضعیت کلینیکی اینگونه بیماران ازجمله درماتیت آتوپیک میشوند. لذا در مطالعهی حاضر اجزای آلرژیزای ک. هرباروم با روش ایمونوبلاتینگ مورد بررسی قرار گرفته است.*

روش بررسی: *ک. هرباروم در محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد. تودهی میسلیومی جمعآوری شده با استفاده از ازت مایع و دانههای شیشهای (glass bead) شکسته شد. سپس نمونهها سانتریفیوژ شده و محلول رویی (عصارهی خام) با روش SDS-PAGE تفکیک شد. پس از انجام بلاتینگ، اجزای پروتئینی با سرم بیماران مورد مطالعه مجاور شدند و باندهای پاسخدهنده به IgE با آنتیبادیهای ضد IgE انسانی که به وسیلهی آنزیم نشاندار شده بود، در یک سوبسترای رنگی نمایان شد.*

یافتهها: *در SDS-PAGE عصارهی خام ک. هرباروم تعداد ۱۶ باند با وزن مولکولی بین ۱۵/۱تا۱۱۰ کیلودالتون را نشان داد. باندهای ۱۵/۱، ۱۸/۴، ۲۵/۱، ۳۶/۳، ۴۵ و ۵۴ کیلودالتونی به عنوان باندهای قوی معین شدند. در ایمونوبلاتینگ، باندهای پروتئینی با وزنهای مولکولی ۱۵/۱، ۱۸/۴، ۴۲ و ۱۱۰ کیلودالتونی با IgE سرمهای بیماران مبتلا به درماتیت آتوپیک واکنش قوی نشان دادند.*

نتیجهگیری: *نتایج فوق نشان داد که باندهای قوی در SDS-PAGE، بیشترین واکنش را با آنتیبادیهای IgE ضد ک. هرباروم در تکنیک ایمونوبلاتینگ داشتهاند. لذا قدرت باندها در SDS-PAGE میتواند در پاسخ به IgE اثرگذار باشد. مانند دیگر مطالعات، ما نیز تصور میکنیم که آنتیژنهای ک. هرباروم میتواند شروعکننده‌ی واکنشهای آلرژیک در بیماران مبتلا به درماتیتآتوپیک باشد.*

واژگان کلیدی: کلادوسپوریوم هرباروم، درماتیت آتوپیک، IgE، ایمونوبلاتینگ

* دکترای تخصصی قارچشناسی پزشکی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مازندران
** دانشجوی کارشناسیارشد قارچشناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
*** متخصص پوست، مو و زیبایی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی مازندران
**** دکترای تخصصی قارچشناسی پزشکی، استاد دانشگاه علوم پزشکی مازندران
***** دکترای تخصصی آمار حیاتی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی مازندران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

کلادوسپوریوم هرباروم (ک. هرباروم) به عنوان یکی از منابع شایع آئروآلرژن عامل بیماری‌های آلرژیک، تقریبا از همه‌ی مناطق آب و هوایی و اکثر کشورها گزارش شده است (۵-۱). نتایج چند سال اخیر نشان داده است که ک. هرباروم می‌تواند به عنوان عاملی بیماری‌زا در القای واکنش‌های آلرژی و بروز ضایعات اگزمایی در بیماران مبتلا به درماتیت‌آتوپیک نقش داشته باشد (۱۰-۶).

مطالعه‌ی نولز و همکاران نشان داد که میزان شیوع IgE اختصاصی برعلیه ک. هرباروم در بین قارچ‌ها رتبه‌ی اول را دارد. این محققین استنتاج نمودند که حساسیت نسبت به قارچ‌ها در دوران کودکی شایع می‌باشد و با سن در ارتباط است (۶). در مطالعه‌ی شافر و همکاران IgE توتال و اختصاصی نسبت به آلرژن‌های موجود در هوا از جمله ک. هرباروم با روش(Radioallergosorbent test [RAST]) مورد آنالیز قرارگرفت که ۳۷ درصد بچه‌ها حداقل نسبت به یک آلرژن حساس بودند (۹). شناسایی اجزایی از ک. هرباروم که با IgE اختصاصی پاسخ می‌دهند نیز مورد توجه محققان قرارگرفته است.

لون استین و همکاران با استفاده از روش (Crossed- radioimmunoelectrophoresis [CRIE]) نشان دادند که عصاره‌ی حاصل شامل ۵۷ آنتی‌ژن و حداقل ۵ آلرژی‌زاست (۱۱). به علاوه اوکردست نیز نشان داد که این عصاره شامل ۴ آلرژی‌زای ماژور و ۱۰ تا ۲۰ آلرژی‌زای مینور می‌باشد (۱۲). درحالی‌که در مطالعه‌ی ژرنگ و همکاران با روش وسترن بلات، ده جز با وزن‌های مولکولی ۱۵ تا ۱۴۳ کیلودالتون مشخص گردید. هم‌چنین در این مطالعه با رنگ‌آمیزی نقره‌ی ژل حاصل از الکتروفورز دو بعدی سی جزو پروتئینی در این‌گونه تشخیص داده شد (۱۳).

از آن‌جا که ک. هرباروم یکی از شایع‌ترین قارچ‌های موجود در هوای اکثر کشورها محسوب می‌شود، بنابراین اجزای آلرژن آن می‌تواند به طور مرتب در دسترس سلول‌های ایمنی قرار گرفته و واکنش‌های آلرژیک را تداوم بخشد. به نظر می‌رسد در چنین مواقعی استفاده از درمان ضدقارچی و پیشنهاد راهکارهای مناسب برای جلوگیری از تماس یا برخورد افراد آتوپیک با این آلرژن‌ها در بهبود بیماری مؤثر باشد. علاوه بر آن، مطالعات نشان داده است که کلادوسپوریوم شایع‌ترین قارچ جدا شده از هوای شهر ساری و بسیاری از شهرهای دیگر ایران می‌باشد (۱۶-۱۴). از طرفی بررسی‌های انجام شده در کشورهای مختلف با شرایط جغرافیایی متفاوت در ارتباط با ارزیابی بیماران آلرژیک نسبت به کلادوسپوریوم و هم‌چنین اجزای آلرژن کلادوسپوریوم، نشان از تنوع و تفاوت در میزان و نوع واکنش‌ها می‌باشد، لذا در مطالعه‌ی حاضر اجزای آلرژن ک. هرباروم با روش ایمونوبلاتینگ مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

نمونه‌های سرم: تعداد ۱۰۰ بیمار (با محدوده‌ی سنی ۴ ماه تا ۶۰ سال) مراجعه‌کننده به درمانگاه پوست بیمارستان بوعلی‌سینای ساری طی مهر ۱۳۸۳ تا اردیبهشت ۱۳۸۵ به طریق نمونه‌برداری مستمر انتخاب شدند. به این ترتیب که پس از معاینه به وسیله‌ی پزشک متخصص پوست در صورت ابتلا به بیماری درماتیت‌آتوپیک (بر اساس معیارهای Hanifin-Rajka) وارد مطالعه شدند (۱۷). ۵ میلی‌لیتر خون از بیماران گرفته شد و در آزمایشگاه سرم آن‌ها جدا شده و تا انجام آزمایشات بعدی در ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

تهیه‌ی عصاره‌ی خام از کلادوسپوریوم هرباروم: ابتدا ک. هرباروم (PTCC 5202) تهیه شده از پژوهشکده‌ی بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران در محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (۵۰ میلی‌گرم در یک لیتر) کشت داده شد. پس از تهیه‌ی سوسپانسیونی

Archive of SID

www.SID.ir

غلیظ از کپک در آب مقطر استریل عمل انبوه‌سازی آن در محیط سابورو دکستروز براث انجام گردید. سپس با استفاده از دستگاه پمپ خلا توده‌ی میسلیال از محیط مایع جدا گردید و در درون پلیت استریلی داخل فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

به منظور شکستن سلول‌ها، مقدار مورد نیاز از توده‌ی میسلیال ک. هرباروم درون هاون استریل ریخته شد و با اضافه نمودن میزان کافی از ازت مایع سلول‌های کلادوسپوریوم با دسته‌ی هاون به صورت پودر در آمده و درون لوله‌های درپیچ‌دار استریل ریخته شد. سپس محلول (Phosphate Buffer Salin [PBS]) (۰۵/ مولار و pH= ۷/۴) حاوی آنتی‌پروتئاز PMSF (۱ میلی‌مول به ازای هر لیتر) در لوله‌ها ریخته شده و تعدادی دانه‌ی شیشه‌ای به لوله‌ها اضافه گردید، به طوری که سوسپانسیون کمی بالاتر از دانه‌های شیشه‌ای قرار گرفته باشد. در اثر ورتکس و برخورد دانه‌های شیشه‌ای با دیواره‌ی سلول‌های کلادوسپوریوم به تدریج این سلول‌ها شکسته شدند. برای خنک نگه‌داشتن سوسپانسیون داخل لوله پس از یک دقیقه ورتکس، لوله به مدت ۵ دقیقه در داخل ظرف حاوی خرده‌های یخ قرار داده شد. پس از آن، عمل فوق ۱۰ بار تکرار شد و به طور متناوب با امتحان میکروسکوپی سوسپانسیون، نحوه‌ی شکسته شدن کلادوسپوریوم ارزیابی گردید. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس سانتریفیوژ با دور پایین (۳۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه) و بعد بر روی عصاره‌ی به دست آمده سانتریفیوژ با دور بالا (۱۵۵۰۰ دور به مدت ۲ ساعت) انجام گردید. در نهایت عصاره‌ی خام به دست آمده پس از تغلیظ با کیسه‌ی دیالیز (سیگما و Cut off = 12kDa) در ویال‌های کوچک تقسیم گردیده و برای ادامه‌ی آزمایشات در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

SDS-PAGE: این روش در یک تانک الکتروفورز عمودی (پایا پژوهش- مشهد) به روش Laemmli (۱۸) با ژل جداکننده‌ی ۱۲/۵ درصد (بافر ژل جداکننده Tris-HCl ۳M ،pH= ۸/۸) و ژل متراکم‌کننده‌ی ۵ درصد (بافر ژل متراکم‌کننده Tris-HCl0/5M ،pH=۶/۸) در یک سیستم بافری غیرپیوسته (Tris ۰/۱۹۲M, Glycin ۰/۱%w/v, pH=۸/۳ SDS ۰/۰۲۵M,) با جریان الکتریکی ۱۰۰ ولت و به مدت ۲/۵ ساعت انجام گردید. محلول رنگ‌آمیزی شامل متانول ۴۰ درصد، اسیداستیک ۱۰ درصد و (Coomassia Brilliant Blue R-۲۵۰ [CBB]) ۰/۱ درصد در آب مقطر بود. برای رنگ‌زدایی ژل از محلول متانول ۳۰ درصد و اسیداستیک ۱۰ درصد به مدت ۲ ساعت استفاده شد.

ایمونوبلاتینگ: انتقال پروتئین‌های مجزا شده و پروتئین استاندارد از ژل جداکننده به صفحه نیتروسلولز ۰/۴۵ میکرومتر (Amersham life Hybond-c Extra, Science) با استفاده از تانک بلاتینگ مرطوب (پایا پژوهش- مشهد) و با روش توبین و همکارانش (۱۹) انجام شد. بافر انتقال حاوی گلایسین (۱۹۲میلی‌مول)، تریس (۲۵میلی‌مول)، SDS (۰/۰۳ w/v درصد) و متانول (pH=۸/۳ ۲۵v/v درصد) در آب مقطر بود. عمل انتقال پروتئین از ژل به صفحه‌ی نیتروسلولز با جریان‌الکتریکی ۳۰۰ میلی‌آمپر به مدت ۳ ساعت و در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گرفت. بعد از عمل انتقال، برای متوقف ساختن اتصالات غیراختصاصی، صفحه‌ی نیتروسلولز در ظرف حاوی PBS و (Bovine Serum Albumin [BSA]) ۱ درصد و توین ۲۰ (۰/۰۵ درصد) (PBS-BSA-TW) به مدت یک شب و در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن در بافر شست‌وشو (PBS-TW) سه بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه شست‌وشو شد. سپس کاغذ نیتروسلولز برش داده شد و در چاهک‌های مخصوص که حاوی سرم بیماران (برای هر بیمار به طور جداگانه) با رقت ۱:۱ در

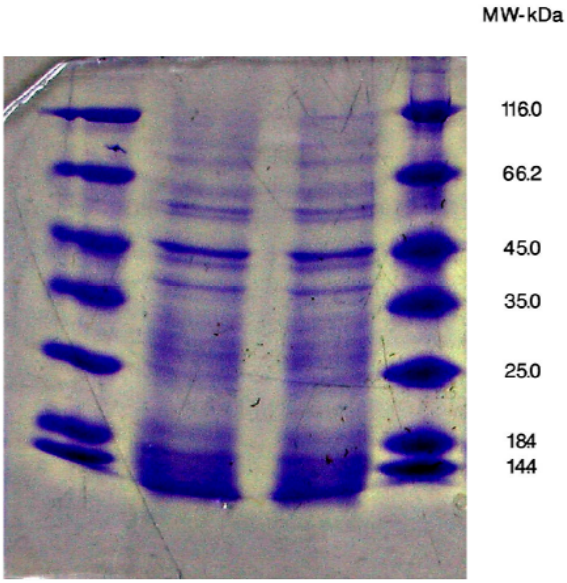
Archive of SID

www.SID.ir

PBS-BSA-TW بود به مدت ۲ ساعت و در حرارت اتاق قرار داده شد. پس از آن مجددا سه بار عمل شستوشو انجام گردید. سپس به هر کدام از چاهکها، آنتیبادی ضد IgE انسانی کونژوگه با (Antihuman IgE Conjugated With Horseradish Peroxidase(sigma)[HRP]) (با رقت ۱:۱۰۰ با PBS-BSA-TW) اضافه و به مدت یک ساعت در شرایط تاریکی و در حرارت اتاق قرار داده شد. پس از شستوشو، برای نمایان ساختن اجزای متصل شونده به IgE از سوبسترای مناسب (۶ میلیگرم (3.3 –Diaminobenzidine Tetrahydrochloride [DAB]) سیگما در ۹ میلیگرم تریس ۰/۰۱ مولار با pH= ۷/۶ و ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد) استفاده شد. در نهایت با اندازهگیری فاصلهی طی شده توسط مولکول از مبدأ و تعیین (Relative Migration [RF]) آن و با استفاده از منحنی استاندارد، وزن مولکولی پروتئینهای رنگ شده تعیین گردید.

یافتهها

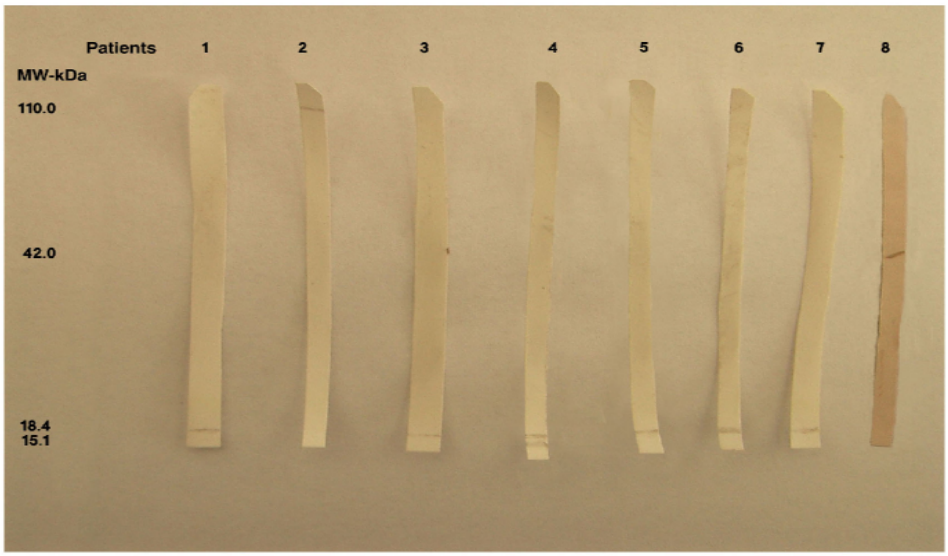
شکل ۱ اجزای پروتئینی تفکیک شده در روش SDS-PAGE را نشان میدهد. با این روش مشخص گردید که ک. هرباروم از ۱۶ باند پروتئینی با اوزان مولکولی بین ۱۵/۱ تا ۱۱۰ کیلودالتون تشکیل شده است. باندهای پروتئینی بر اساس پهنای ایجاد شده بر روی ژل به سه دستهی قوی، متوسط و ضعیف طبقهبندی شدند که عبارت بودند از ۱۵/۱ (قوی)، ۱۸/۴ (قوی)، ۲۵/۱ (قوی)، ۲۶/۰ (متوسط)، ۲۸/۲ (متوسط)، ۳۰/۲ (ضعیف)، ۳۲/۰ (ضعیف)، ۳۶/۳ (قوی)، ۴۲/۰ (ضعیف)، ۴۵/۰ (قوی) ۵۲/۵ (ضعیف)، ۵۴/۰ (قوی)، ۶۰/۳ (ضعیف)، ۷۶/۰ (ضعیف)، ۸۹/۱ (ضعیف) و ۱۱۰ (ضعیف) کیلودالتون.



شکل ۱: نحوهی تفکیک اجزای پروتئینی کلادوسپوریوم هرباروم با روش SDS-PAGE

شکل ۲، نحوهی پاسخ آنتیژنهای کلادوسپوریوم هرباروم در مواجهه با سرم بیماران مورد مطالعه از نظر IgE اختصاصی را با روش ایمونوبلاتینگ نشان میدهد. بر اساس نتایج به دست آمده مشخص گردید که از ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه ۸ بیمار (۸ درصد)، به چهار جزو از باندهای پروتئینی با وزنهای مولکولی ۱۵/۱، ۱۸/۴، ۴۲ و ۱۱۰ کیلودالتون واکنش قوی نشان دادند. از ۸ بیمار با پاسخ مثبت در روش ایمونوبلاتینگ، ۶ بیمار (۷۵ درصد) به جز ۱۸/۴ کیلودالتونی (که در روش SDS-PAGE باند قوی نشان داد) پاسخ دادند. یک نفر (۱۲/۵ درصد) از ۸ بیمار به دو جز ۱۸/۴ و ۱۵/۱ کیلودالتون، درحالیکه اکثریت افراد تنها به یکی از اجزا پاسخ دادند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲: نحوه‌ی پاسخ پروتئین‌های تفکیک شده کلادوسپوریوم هرباروم با IgE اختصاصی سرم بیماران مورد مطالعه

بحث

کلادوسپوریوم، از جمله شایع‌ترین قارچ‌هاست که در هوای بیرون و درون خانه با آن مواجه هستیم (۲۴-۱۴). گونه‌های کلادوسپوریوم به جز در مورد بیماران اختلال ایمنی معمولا برای انسان پاتوژن واقعی نیستند، با وجود این می‌توانند در افراد حساس شروع‌کننده‌ی واکنش‌های آلرژیک باشند. گونه‌ی ک. هرباروم یکی از منابع ایجاد کننده‌ی واکنش‌های آلرژیک در اکثر نقاط دنیاست (۵-۱). هدف از مطالعه‌ی حاضر به دست آوردن ترکیبات آنتی‌ژنی مناسب از ک. هرباروم و سپس شناسایی و مشخص نمودن آنتی‌ژن‌های آن که با IgE باند گردیدند، می‌باشد.

محققین نشان داده‌اند که برخی از آئروآلرژن‌ها به ویژه ک. هرباروم با تحریک سیستم ایمنی و ایجاد آنتی‌بادی IgE در به وجود آمدن برخی از حالات کلینیکی بیماری درماتیت‌آتوپیک دخالت دارند (۲۵ و۲۴، ۹، ۷، ۶) و در این ارتباط در دهه‌های اخیر توجه خاصی به نقش ک. هرباروم به عنوان یک عامل در بروز این بیماری پیدا شده است. در مطالعه‌ی حاضر نتایج به دست آمده از روش SDS-PAGE نشان داد که عصاره‌ی خام به دست آمده از ک. هرباروم واجد ۱۶ باند پروتئینی با اوزان مولکولی ۱۵/۱ الی ۱۱۰ کیلودالتون می‌باشد. در حالی‌که لون‌استین و همکاران با روش CRIE ۵۷ آنتی‌ژن از این‌گونه را جدا کردند (۱۱). اوکراست در مطالعه‌ای دیگر ثابت کرد که عصاره‌ی ک. هرباروم شامل حداقل ۶۰ آنتی‌ژن است (۱۲). السوانی و همکاران با استفاده از تکنیک SDS-PAGE باندهای با وزن مولکولی ۳۴ تا ۷۹ کیلودالتون را در کلادوسپوریوم نشان دادند (۲۶). به نظر می‌رسد منبع و نحوه‌ی آماده‌سازی عصاره و نوع روش به کارگیری آن، در به دست آوردن نتایج مؤثر بوده است.

در مطالعه‌ی حاضر نحوه‌ی پاسخ باندهای پروتئینی ک. هرباروم با IgE سرم بیماران مبتلا به درماتیت‌آتوپیک با روش ایمونوبلاتینگ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این مطالعه نتایج حاصل از ایمونوبلاتینگ مشخص نمود که ۴ باند پروتئینی با وزن‌های مولکولی ۱۵/۱، ۱۸/۴، ۴۲ و ۱۱۰

Archive of SID
www.SID.ir

کیلودالتون با IgE سرم‌های به دست آمده از بیماران مبتلا به درماتیت‌آتوپیک واکنش قوی نشان می‌دهند. از ۸ بیماری که در ایمونوبلاتینگ به IgE ضد ک. هربارووم پاسخ مثبت دادند، ۶ نفر آن‌ها (۷۵ درصد) به باند ۱۸/۴ کیلودالتون که باند قوی در SDS-PAGE بوده است پاسخ داده‌اند. همان‌گونه که مشخص شد در مطالعه‌ی حاضر ۴ باند از ک. هربارووم دارای خاصیت آلرژی‌زا بودند در حالی‌که در مطالعه لوناستین و همکاران ۵ مورد از ۵۷ آنتی‌ژن، در مطالعه‌ی اوکراست ۲۰ مورد از ۶۰ آنتی‌ژن و در مطالعه‌ی ماری و همکاران یک مورد دارای خاصیت آلرژی‌زا بودند (۱۲ و ۱۱، ۸). ژانگ و همکاران، در مطالعه‌ی خود بر روی اجزای آلرژی‌زای کلادوسپوریوم هربارووم با روش وسترن بلات با استفاده از سرم بیماران حساس، ده جز با وزن‌های مولکولی ۱۵ تا ۱۴۳ کیلودالتون را مشخص نمودند (۱۳). در این مطالعه دو نفر از ده بیمار، به تمامی آلرژی‌زاهای کلادوسپوریوم پاسخ نشان دادند، در حالی‌که اکثریت آن‌ها تنها به یکی از اجزا پاسخ دادند. در حالی‌که در مطالعه‌ی حاضر یک نفر از ۸ بیمار، به دو جز و بقیه تنها به یکی از اجزا پاسخ داده بودند. مقایسه‌ی نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر و سایر مطالعات انجام شده در زمینه‌ی آلرژی‌زاهای موجود در عصاره‌ی به دست آمده از ک. هربارووم نشان‌دهنده‌ی تنوع تعداد باندهای آلرژی‌زا می‌باشد که به نظر می‌رسد استفاده از تکنیک‌های مختلف برای به دست آوردن عصاره و نحوه‌ی ارزیابی پاسخ IgE سرمی برعلیه این قارچ در به دست آمدن این نتایج تأثیرگذار بوده است. هم‌چنین نتایج مطالعه‌ی حاضر در یک هماهنگی نسبی با سایر مطالعات انجام شده قبلی نشان می‌دهد که عصاره‌ی ک. هربارووم واجد آلرژی‌زاهایی با وزن‌های مولکولی ۱۰ الی ۱۵۰ کیلودالتون می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر ۸ درصد افراد مبتلا به درماتیت‌آتوپیک، نسبت به قارچ ک. هربارووم حساسیت نشان دادند (۱۷). در حالی‌که در مطالعه‌ی شاکر و همکاران (۹) با روش RAST ۳۷ درصد بیماران، در مطالعه خزایی و همکاران (۲۷) با روش SPT ۴۷/۱۲ درصد بیماران و در مطالعه‌ی ریجولا و همکاران (۲۸) با روش تست پوستی تنها ۲/۷ درصد افراد مبتلا به درماتیت‌آتوپیک به قارچ مذکور حساسیت نشان دادند (۲۸ و۲۷، ۹). تفاوت نتایج به دست آمده در این مطالعه با سایر مطالعات می‌تواند ناشی از تفاوت در سن بیماران مورد مطالعه، شدت بیماری، نوع ترکیب آنتی‌ژنی ک. هربارووم، سطح IgE توتال در بیماران و سایر عوامل تأثیرگذار باشد. هم‌چنین نتایج مطالعه‌ی حاضر در مقایسه با نتایج گرفته شده از مناطق سردسیر هماهنگی نسبی دارد. با توجه به محدودیت مطالعه‌ی حاضر در دست‌یابی به تعداد کافی از بیماران مبتلا به درماتیت‌آتوپیک در یک زمان کوتاه‌تر، به نظر می‌رسد در آینده بتوان با همکاری تیم‌های تحقیقاتی از سایر مناطق و یافتن تعداد بیشتر بیماران مبتلا به درماتیت‌آتوپیک، نقش آئروآلرژی‌زاهای قارچی به ویژه کلادوسپوریوم به عنوان شایع‌ترین قارچ موجود در هوای اکثر مناطق کشور، مطالعه‌ی دقیق‌تر در این زمینه انجام داد.

منابع

1- Hoffman RD. Mould allergens. In: Al-Doory, Domson, Editors. Mould allergy. 1st ed. Philadelphia: Lea and febiger; 1984, 100-5.

2- Nilsson D, Aas K. Immunological specificity of diagnostic tests for bronchial allergy to Cladosporium herbarum. *Acta Paediatr scand.* 1976; 65(1): 33-8.

Archive of SID
www.SID.ir

3- Solomon WR. Aerobiology and inhalant allergens I. Pollens and fungi. In: Meddleton E, Reed CE, Ellis EF, Editors. Allergy: principles and practice. 3rd ed. St Louis: Mosby; 1988; 312-72.

4- Tarlo SM, fradkin A, Tobin RS. Skin testing with extracts of fungal species derived from the homes of allergy clinic patients in Toronto, Canada. *Clin Allergy.* 1988; 18(1): 45-52.

5- Simon-Nobbe B, Denk U, Schneider PB et al. NADP-dependent mannitol dehydrogenase, a major allergen of Cladosporium herbarum. *J Biol Chem*. 2006; 281(24): 16354-60.

6- Nolles G, Heokstra MO, Schouten JP, Gerritsen J, Kauffman HF. Prevalence of immunoglobulin E for fungi in atopic children. *Clin Exp Allergy.* 2001; 31(10): 1564-70.

7- Bogacka E, Jahnz-Rozyk K. Allergy to fungal antigens. *Pol Merkur Lekarski.* 2003; 14(83): 381-4.

8- Mari A, Schneider P, Wally V, Breitenbach M, Simon-Nobbe B. Sensitization to fungi: epidemiology, comparative skin tests, and IgE reactivity of fungal extracts. *Clin Exp Allergy*. 2003; 33: 1429-38.

9- Schäfer T, Heinrich J, Wjst M, Adam H, Ring J, Wichmann H-E. Association between severity of atopic eczema and degree of sensitization to aeroallergens in schoolchildren. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 104(6): 1280-4.

10- Bisht V, Kukreja N, Singh BP, Arora N, Sridhara S. Current Status of Fungal Allergens. *Indian J Allergy Asthma Immunol.* 2003; 17(1): 9-19.

11- Lowenstein H, Aukrust L, Gravesen S. Cladosporium herbarum extract charectrized by means of quantitative immunoelectrophoretic methods with special attention to immediate type allergy. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1977; 55(1-6): 1-12.

12- Aukrust L. Crossed radioimmunoelectrophoretic studies of distinct allergens in two extracts of Cladosporium herbarum. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1979; 58(4): 375-90.

13- Zhang L, Curran I, Muradia G, Rode H, Vijay HM. Two-dimentional immunoblot analysis of allergens of Cladosporium herbarum. *Clin Exp Allergy.* 1994; 24(3): 263-9.

14- Hedayati MT, Mayahi S, Aghili R, Goharimoghadam K. Airborne Fungi in Indoor and Outdoor of Asthmatic Patients Home, Living in the City of Sari. *Iran J Allergy Asthma immunol.* 2005; 4(4): 189-191.

15- Shadzi S, Zahraee MH, Chadeghanipour M. Incidence of airborne fungi in Isfahan, Iran. *Mycoses.* 1993; 36: 69-73.

۱۶- هدایتی محمدتقی و محمدپور رضاعلی. بررسی قارچ‌های آلوده‌کننده هوا و وسایل اتاق‌های عمل بیمارستان‌های استان مازندران. *مجله‌ی دانشگاه علوم پزشکی گیلان* ۱۳۷۸، سال۸ ، شماره‌ی ۲۹ و ۳۰: صفحه‌ی ۵۶.

17- Hanifen J, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereol.* 1980; 92: 44-7.

Archive of SID

www.SID.ir

18- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-5.

19- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Nalt Acad Sci U.S.A.* 1979; 76: 4350-4.

۲۰- کچویی رضا، امامی مسعود، گرامی شعار محسن. بررسی فلور قارچ‌های بیماری‌زا در هوای منطقه‌ی کویری شهرستان اردستان. *فصلنامه‌ی علمی، پژوهشی فیض* ۱۳۸۳، شماره‌ی ۲۹: صفحات ۵۰-۴۳.

21- Peternel R, Culig J, Hrga I. Atmospheric concentration of Cladosporium spp. and Alternaria spp. spores in Zagreb(Croatia) and effects of some meteorological factors. *Ann Agric Environ Med.* 2004; 11: 303-07.

22- Kasprzyk I, Rzepowska B, Wasylów M. Fungal spores in the atmosphere of Rzeszów (south-east Poland). *Ann Agric Environ Med.* 2004; 11(2): 285-9.

23- Mezzari A, perin C, Júnior SAS. Os fangus anemófilos e sensibilização em indiví duos atópicos em porto alegre, rs. *Res Assoc Med Bras.* 2003; 49(3): 270-3.

24- Faergemann J. Atopic dermatitis and fungi. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(4): 545-63.

25- Gustafsson D, Sjöberg O, Foucard T. Sensitization to food and airborne allergens in children with atopic dermatitis followed up to 7 years of age. *Pediatr Allergy Immunol.* 2003; 14(6): 448-52.

26- Al-Suwaini AS, Bahkali AH, Hasnain SM. Airborne viable fungi in Riyadh and allergenic response of their extracts. *Mycoses.* 2001; 44(9-10): 401-06.

27- Khazaei HA, Hashemi SR, Aghamohammadi A, Farhoudi F, Rezaei N. The study of type 1 allergy prevalence among people of south-east of Iran by skin prick test using common allergens. *Iran J Allergy Asthma and Immunol*. 2003; 2(3): 165-8.

28- Reijula K, Leino M, Mussalo-Rauhamaa H et al. IgE-mediated allergy to fungal allergens in Finland special reference to Alternaria alternate and Cladosporium herbarum. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003; 91(3); 280-7.

Archive of SID

www.SID.ir

Investigation into Allergenic Components of Cladosporium herbarum by Immunoblotting Technique.

Hedayati MT, Kabuli S, Hajheydari Z, Shokohi T, Mohammadpour RA

Corresponding Author's Address: School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

Email: hedayaty2001@yahoo.co.uk

Background and Objective: Numerous studies on *Clasporidium herbarum* antigens have shown that these antigens play a major role in produceing specific IgE in atopic individuals and exacerbate the patients' clinical conditions like atopic dermatitis. Thus, in this study allergenic components of *clasporium herbarum* were investigated using immunoblotting technique.

Materials and Methods: *Cladosporium herbarum* was cultured on Sabouraud's dextrose agar. The grown mycelia were harvested and ruptured by liquid nitrogen and glass beads. Samples were centrifuged and the supernatant was collected as crude extract. The crude extract was separated through sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The separated proteins were transferred to nitrocellulose filter and then soaked through atopic dermatitis patients' sera. The responsive bands to IgE were revealed by antihuman IgE antibodies conjugated with enzyme in chromogenic substrate.

Results: In SDS-PAGE, the crude extract of *Cladosporium herbarum* showed 16 different protein bands with molecular weight between 15.1 and 110 kDa. The bands with 15.1, 18.4, 25.1, 36.3, 45 and 54 kDa were identified as strong bands. In immunoblotting, the bands with molecular weights of 15.1, 18.4, 42 and 110 kDa showed a strong reaction with IgE sera from patients with atopic dermatitis.

Conclusion: The results of this study showed that the strong bands in SDS-PAGE had the highest reaction with anti- *Cladosporium herbarum* IgE antibody in immunoblotting technique. Thus, we speculate the intensity of bands can affect IgE response. Like other studies we contend that *Cladosporium herbarum* antigen can initiate allergic reaction in atopic dermatitis patients.

Key words: Cladosporium herbarum, Atopic dermatitis, IgE, Immunoblotting.

Archive of SID

www.SID.ir