

Krystyna OBTUŁOWICZ<sup>1</sup>  
 Jacek WAGA<sup>2</sup>  
 Wojciech DYGA<sup>1</sup>

## Gluten - mechanizmy nietolerancji, objawy i możliwości lecznicze IgE-zależnej alergii na gluten w świetle aktualnych badań kliniczno-immunologicznych

Gluten - tolerance, symptoms and  
 of IgE-related allergy for gluten in  
 immunological studies

<sup>1</sup>Zakład Alergologii Klinicznej i Środkowej  
 UJCM w Krakowie  
 Kierownik:  
 Dr hab. med. Ewa Czarnobilska

<sup>2</sup>Zakład Roślin Zbożowych  
 Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin  
 Państwowy Instytut Badawczy  
 Kierownik:  
 Dr Jacek Waga

**Dodatkowe słowa kluczowe:**  
 gluten  
 alergia IgE zależna  
 omega 5

**Additional key words:**  
 gluten  
 IgE dependent allergy  
 omega 5

Praca naukowa finansowana ze środków  
 na naukę w latach 2010-2013 jako projekt  
 badawczy nr N310 162238 oraz N310  
 182938.

Gluten jest produktem chemiczno-chemicznego wiązania białek prolaminowych pszenicy (glutenin i gliadyn) w środowisku wodnym. IgE zależna alergia może być indukowana przez gluten jako składnik pokarmów, bądź przez białka prolaminowe pszenicy obecne w mące pszennej jako aerozol powietrzny. Celem badania była kliniczna analiza 13 chorych, u których wykazano podwyższony poziom asIgE dla glutenu oraz identyfikacja najsilniej alergizujących frakcji białkowych pochodzących z kilku prób pszenicy z wykorzystaniem surowicy badanych osób.

Analiza kliniczna wykazała zawodo-wole tło alergii na gluten u 9 badanych pod postacią nieżyty nosa, astmy i wyprysku powietrznego, których objawy ustąpiły wraz z izolacją od pracy zawodowej pomimo stosowania normalnej diety. U 4 chorych z ciężkimi postaciami pokrzywki przewlekłej i AZS uczulonych równocześnie na trawy wprowadzenie diety bezglutenowej spowodowało pewną poprawę zdrowia. Badania białek pszenicy ujawniły znaczny ich polimorfizm zależny od badanej próby pszenicy. Z białek izolowano frakcje nisko- i wysokocząsteczkowe glutenin oraz frakcje alfa, beta, gamma i omega gliadyn. Wykazano najsilniejsze immunogenne działanie frakcji omega 5 gliadyn. Usunięcie tej frakcji było istotne dla zmniejszenia reaktywności skóry badanych chorych ocenianej punktowym testem skórny.

Gluten is the product of a chemical bond of wheat prolamin proteins (gliadins and glutenins) in an aqueous medium. IgE mediated gluten allergy can be induced either by gluten as an ingredient in foods or wheat prolamines present in the air. The aim of the study was clinical analysis of 13 patients, who demonstrated elevated levels of gluten specific IgE and identification of the most allergenic protein fractions from several samples of wheat using serum of examined subjects. Clinical analysis showed the occupational allergy to gluten in the form of rhinitis, asthma and airborne dermatitis in 9 subjects, whose symptoms disappeared during isolation from occupational exposure despite the use of a normal diet. In case of 4 patients with severe forms of chronic urticaria and atopic dermatitis, who are also allergic to grass pollen at the same time, the introduction of a gluten-free diet resulted in improvement of health conditions.

The study of wheat protein fractions revealed a significant polymorphism dependent on the wheat sample. In the protein fractions, low and high molecular glutenin fractions, and alpha, beta, gamma, and omega-gliadins were separated. It has been shown that the strongest immunogenic effect causes omega-5 gliadin fraction. The removal of this fraction resulted in reduction of skin reactivity evaluated by skin prick test in the studied patients.

### Wstęp

Omawianie problemów alergii na gluten wymaga uściślenia i zdefiniowania wybranych terminów, którymi posługuje się środowisko medyczne, a które zostały zaczerpnięte z nauki o żywności i żywieniu człowieka.

W ujęciu historycznym, po raz pierwszy definicję glutenu sformułował włoski chemik Beccari w połowie XVIII stulecia. Zgodnie z definicją Beccari'ego gluten jest substancją białkową, która powstaje w trakcie miesza-

nia mąki pszennej z wodą [1]. Z przytoczonej definicji wynika przede wszystkim, że gluten jest substancją specyficzną dla pszenicy i nie należy go łączyć z innymi gatunkami roślin zbożowych, a w szczególności z żytem, jęczmieniem czy owsem. Co więcej, powstaje on w wyniku interakcji składników chemicznych mąki pszennej z wodą, a więc nie jest składnikiem ziarniaków roślin zbożowych, ani uzyskanej z nich mąki. Jest natomiast obecny we wszystkich produktach spożywczych i przemysłowych wytwarza-

Adres do korespondencji:  
 Zakład Alergologii Klinicznej i Środowiskowej  
 31 531 Kraków  
 ul. Śniadeckich 10  
 Tel/fax: +48 12 423 11 22  
 e-mail: mmobtulo@cyf-kr.edu.pl

nych z mąki pszennej.

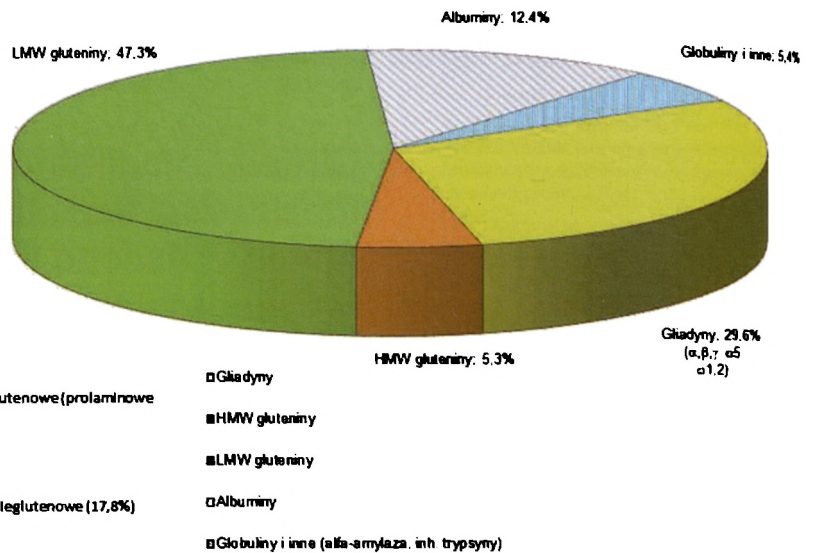
Gluten (po połączeniu z wodą) tworzą przede wszystkim gliadyny i gluteniny (Ryc. 1) - białka zapasowe ziarniaków pszenicy zaliczane do grupy prolamin, określane tak z uwagi na wysoką zawartość proliny i glutaminy w swoim składzie aminokwasów. Białka prolaminowe pszenicy określa się mianem białek glutenowych z uwagi na istotną rolę jaką odgrywają one w kształtowaniu struktury chemicznej glutenu. Są one białkami polimorficznymi, a genetycznie uwarunkowane zróżnicowanie budowy fizykochemicznej wynika ze specyfiki ich dziedziczenia. Tradycyjny system klasyfikacji gliadyn opiera się na zróżnicowaniu prędkości migracji indywidualnych frakcji białkowych w żelu elektroforetycznym A-PAGE (AcidPolyAcrylamideGelElectrophoresis). Gliadyny dzielą się na cztery klasy oznaczone greckimi literami:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\omega$ -5 i  $\omega$ -1,2, przy czym  $\alpha$  obejmuje najszybciej, natomiast  $\omega$ -1,2 najwolniej migrujące frakcje białkowe [2]. Z kolei gluteniny w wyniku elektroforezy SDS-PAGE (SodiumDodecyl-SulphatePolyAcrylamideGelElectrophoresis) dzielą się na podjednostki o wysokiej (HMW gluteniny) i niskiej (LMW gluteniny) masie cząsteczkowej [3].

Białka prolaminowe obecne są także w pozostałych gatunkach roślin zbożowych. Analogami gliadyn mąki pszennej w życie są sekaliny, w jęczmieniu - hordeiny natomiast w owsie - aweniny. Z kolei białka stanowiące odpowiedniki białek gluteninowych określane są wspólną nazwą - gluteniny [3]. Wymienione grupy białek są genetycznie spokrewnione, a chemicznie zbliżone do gliadyn i glutenin pszenicy. Jednak w odróżnieniu od nich prolamin żyta, jęczmienia czy owsa nie posiadają zdolności formowania glutenu, ani jakiegokolwiek innej substancji białkowej o cechach fizykochemicznych porównywalnych z glutenem.

Właściwości alergogenne produktów spożywczych wytwarzanych z mąki czterech podstawowych gatunków zbóż (pszenicy, żyta, owsa, jęczmienia) są wynikiem obecności krótkich, wysoce specyficznych sekwencji aminokwasów zidentyfikowanych w polipeptydach ich białek prolaminowych. Wprowadzone do organizmu osoby uczulonej na białka pszenicy mogą funkcjonować jako epitopy, które wiążąc przeciwciała IgE wywołują objawy chorobowe charakterystyczne dla alergii pokarmowych. Jednym z najważniejszych epitopów wiążących IgE jest pentapeptyd zbudowany z trzech reszt glutaminy i dwóch reszt proliny (QQQPP). Występuje on szczególnie często w polipeptydach  $\gamma$ -gliadyn oraz LMW glutenin jako jedna z sekwencji powtarzalnych [4,5].

Z uwagi na rangę oraz kluczowe znaczenie pszenicy w żywieniu człowieka określenie „alergia na gluten” powinno być rozumiane jako alergia na białka glutenowe obecne w ziarniakach pszenicy pamiętając jednocześnie, że zbliżone objawy chorobowe mogą wywoływać prolaminę obecne w ziarniakach żyta, jęczmienia czy owsa. Mimo wielu osiągnięć w dziedzinie immunologii białek zapasowych zbóż wiedza na temat gliadyn jako alergenów jest - zdaniem niektórych autorów - wciąż jeszcze bardzo niekompletna [6].

Omawiając rolę gliadyn i glutenin



Rycina 1  
Klasyfikacja białek pszenicy.  
Classification of wheat proteins.

jako czynników przyczynowych alergii pokarmowej należy zwrócić uwagę, iż w bielmie ziarniaków pszenicy obok białek glutenowych obecne są również białka nieglutenowe (Ryc. 1). Białka nieglutenowe pszenicy tworzą frakcje albumin i globulin o różnej aktywności biologicznej. Należą do nich m.in. inhibitory egzogennej trypsyny i alfa amylazy. Są to białka o małej masie cząsteczkowej (około 14 kDa) zbudowane z dwóch lub czterech podjednostek. Ważną funkcją tych białek jest ochrona roślin przed chorobami i szkodnikami. Jednakże z medycznego punktu widzenia są one znanymi silnymi alergenami [7-9] odpowiedzialnymi za IgE zależną zawodową astmę oskrzelową rzadko anafilaksję pracowników przemysłu spożywczego - głównie piekarzy i młynarzy, cukierników [10].

W Europie, nietolerancja glutenu jest szczególnym problemem zdrowotnym dorosłych i dzieci ze względu na zwyczaj żywienia i wysoką produkcję pszenicy [11-13]. Aktualnie zgodnie z przyjętym konsensusem przyjmuje się, że istnieją trzy zasadnicze nieprawidłowe reakcje na gluten: alergiczna, autoimmunizacyjna (celiakia, dermatitis herpetiformis i ataksja glutenowa) oraz in. immunologicznie mediowane nadwrażliwości. Z tej przyczyny pojawiają się w grupie schorzeń z nietolerancją glutenu schorzenia o różnym obrazie patogennym, klinicznym, epidemiologicznym skłaniające do wprowadzania nowego nazewnictwa i klasyfikacji tych chorób [14].

Nietolerancja glutenu występuje pod postacią:

1. Choroby trzewnej (celiakia), czyli wrodzonej (w 90% związanej z układem HLA) nietolerancji glutenu wskutek pojawienia się u chorego immuno-toksycznego działania glutenu.

2. Enteropatii w następstwie zmian zapalnych w jelicie cienkim o charakterze przewlekłym lub pod postacią przejściowej (nabytej), zwykle pozapalnej nietolerancji glutenu.

3. Alergii pokarmowej na gluten, występującej u ok. 6% populacji dziecięcej i ok. 2% dorosłych pod postacią IgE-zależnych i

IgE-niezależnych dolegliwości z przewodu pokarmowego i skóry oraz nieżytu nosa i astmy.

4. Choroby Dühringa (dermatitis herpetiformis), której objawy to głównie zmiany skórne kolan, łokci i pośladków pod postacią silnie swędzących zmian pęcherzykowych. Choroba ta jest skórną manifestacją nietolerancji glutenu, nazywaną wręcz skórną postacią celiakii.

5. Ataksji glutenowej (niezborność ruchów). Choroba rzadka, objawiająca się niedowładem rąk, nóg oraz zaburzeniami widzenia. Jest chorobą autoimmunologiczną, towarzyszącą celiakii, której podłożem może być nietolerancja glutenu.

3. Nieceliakalnej (np. kontaktowej) nadwrażliwości na gluten, zwykle błon śluzowych. Z uwagi na wielkocząsteczkowy charakter budowy chemicznej glutenu nie wchłania się przez skórę. Ten rodzaj reakcji mogą indukować kosmetyki, pasta do zębów, płyny do płukania jamy, w których występują choćby śladowe ilości glutenu.

Wśród alergii zależnych od glutenu najbardziej niebezpieczne dla zdrowia i życia człowieka są reakcje anafilaktyczne (WDEIA - ang. „wheat dependent exerciseinduced anaphylaxis”) wywołwane przez gliadyny należące do grupy  $\omega$ -5 [15-23]. Z innych chorób wymienia się pokrzywkę, astmę, atopowe zapalenie skóry czy obrzęk naczynioruchowy [16,18,24,25].

Celiakia, która należy do najbardziej znanych chorób wywołanych przez prolaminę spowodowana jest nieprawidłową reakcją immunologiczną na gluten [12,13]. Jest ona schorzeniem występującym u 0,2-5,6% populacji. W Polsce częstość jej występowania ocenia się na 0,8%. Alergia na gluten jest wciąż mało znana i rzadko rozpoznawana w przeciwieństwie do alergii IgE-zależnej na białka nieglutenowe pszenicy, a zwłaszcza na alfa amylazę [7-9], znaną jako częsta przyczyna zawodowej IgE-zależnej alergicznej astmy piekarzy, młynarzy i cukierników.

Celem niniejszej pracy była:

1. Charakterystyka klinicznych przypad-

ków chorych obejmująca rodzaj schorzenia, obecność cech atopii, identyfikacja substancji uczulających, obecność innych rodzajów schorzeń, zależność stwierdzonych dolegliwości u chorych od spożywanych pokarmów zawierających gluten, wpływ diety bezglutenowej, a także izolacja od ekspozycji pyłu mącznego w przypadkach indukcji objawów chorobowych podczas kontaktu z nimi.

2. Określenie zróżnicowania budowy fizykochemicznej i właściwości alergogennych gliadyn pochodzących z różnych genotypów pszenicy oraz identyfikacja frakcji najsilniej alergizujących.

3. Opracowanie metod eliminacji białek immunoreaktywnych drogą modyfikacji genomu pszenicy.

4. Określenie w jakim stopniu zastosowane modyfikacje mogą przyczynić się do zmniejszenia potencjału alergogenności pszenic.

### Material i metodyka

Do badania włączono 13 dorosłych chorych (3 kobiety i 10 mężczyzn) w wieku 28-58 lat (średnio 35 lat) z podwyższonym poziomem sIgE (>1 U/ml) dla glutenu, z objawami astmy i alergicznego nieżytu nosa (ANN), przewlekłej obrzęko-pokrzywki i atopowego zapalenia skóry (Tab. I) oraz 4 osoby zdrowe (2 kobiety i 2 mężczyzn w wieku 30 - 60 lat) stanowiące grupę kontrolną z poziomem sIgE dla glutenu i alfa amylazy <0,35 U/ml. W surowicach 13 chorych z alergią IgE zależną na gluten oraz 4 osób

zdrowych (grupy kontrolnej) oznaczono stężenie swoistych IgE dla glutenu metodą immunofluorymetryczną stosując aparat UNICAP 100. Poziom tych przeciwciał w badanej grupie chorych wahał się w granicach od 1,84 U/ml do ponad 16,7 U/ml. U osób zdrowych stężenie ich było w normie (<0,35 U/ml).

Celem identyfikacji czynników chorobotwórczych odgrywających istotną rolę w patogenie badanych osób analizowano właściwości immunoreaktywne białek glutenowych i nieglutenowych pszenicy techniką ELISA oraz metodą immunoblotingu po rozdziale elektroforetycznym w systemie SDS-PAGE.

Test ELISA wykonywano w układzie „indirect ELISA” tzn. studzienki płytek mikrofiltracyjnych opłaszczano badanymi roztworami gliadyny w buforze węglanowym w rozcieńczeniu 1:1000, które inkubowano z surowicami ludzkimi rozcieńczonymi 1:5 w PBST.

Na końcu do studzienek wprowadzano roztwór koniugatu (przeciwciała typu „anti-human”) rozcieńczony 1:1000 w PBST. Jako substratu używano ortofenylenodwu-aminę (OPD), a intensywność wybarwienia produktów reakcji immunoenzymatycznej odczytywano przy użyciu czytnika testu ELISA. Wynik odczytu wyrażony w jednostkach gęstości optycznej barwnego substratu (OD – ang. optical density) interpretowano jako wskaźnik immunoreaktywności badanych białek.

Immunobloting wykonywano zgodnie z metodą opisaną we wcześniejszej pracy [25]. Białka rozdzielone metodą SDS-PAGE przenoszono na błony PVDF metodą elektrotransferu półsuchego na aparacie Transblot SD (Bio Rad, USA). Membrany z naniesionymi białkami blokowano w odtłuszczonej surowicy mleku (5%), a następnie inkubowano w surowicy przez 12h. Po usunięciu surowicy do naczynia z membraną dodawano roztwór koniugatu (przeciwciała typu „anti-human” skoniugowane z peroksydazą chrzanową) w PBST na 2 godziny. W ostatnim etapie membrany wybarwiano metodą chemiluminescencyjną i wizualizowano przy użyciu aparatu ChemiDoc™ XRS+ image analyzer (Bio Rad, USA).

Białka gliadynowe izolowano i oczyszczano metodą elektroforezy preparatywnej na żelu poliakryloamidowym w środowisku kwaśnym buforu mleczanowo-glinowego (pH=3,1) w systemie A-PAGE, przy użyciu aparatu do elektroforezy preparatywnej Model 491 PrepCell (BioRad, USA). Do rozdzielania białek wykorzystano zmodyfikowaną metodykę Bushuka i Zillmana [26]. Każdy cykl analizy preparatywnej obejmował: rozdział białek na kolumnie preparatywnej, podział eluentu przy użyciu kolektora frakcji, wstępną identyfikację wyizolowanych białek na podstawie elektroforezy A-PAGE, łączenie frakcji zawierających białka o zbliżonej prędkości migracji w żelu, zagęszczanie połączonych frakcji na koncentratorze CentriVap firmy Labconco. Powtórna iden-

Tabela I  
Kliniczna analiza chorych.  
Clinical analysis of patients.

Lp.	płeć	wiek	wywiad rodzinny	rozpoznanie:	Całkowite IgE [U/ml]	asIgE [U/ml] dla:			SPT*	skuteczna	
						1. glutenu	2. mąki pszennej	3. Alfa-amylazy		dieta bezglutenowa	izolacja od pyłu mąki
1	M	52	+	pokrzywka, obrzęki	586	2,21>0,52	12>0,54	<0,35		+	
2	K	24		nieżyt nosa	186	1,84	13,5	<0,35			+
3	M	28		nieżyt nosa	410	2,1	2	<0,35			+
4	M	58	+	pokrzywka, obrzęki, anafiksja	277	3,43	0,38	<0,35		+	
5	M	38		astma, nieżyt nosa	422	11,4	0,04	<0,35			+
6	M	52	+	astma, nieżyt nosa	4716>1629	16,7	100>73,5	<0,35	+		+
7	M	58		astma, nieżyt nosa	577>317	12,3>10,4	19,7>9,04	<0,35			+
8	M	50	+	pokrzywka, wysięk+	296	1,1		<0,35		+	
9	K	35		astma, nieżyt nosa	361	9,67	38,2	<0,35			+
10	M	4	+	AZS, astma, nieżyt nosa	1318	2,84	15	<0,35		+	
11	M	3		astma, nieżyt nosa, owady	142	4,33	9,57>7,16	<0,35	+		+
12	M	35		astma, nieżyt nosa	154	5,23	36,4>9,2	<0,35	+		+
13	K	48		astma, nieżyt nosa, wyprysk powietrzno-pochodny	256	10,3	22,9	<0,35	+		+

\*SPT- dodatnie testy skórne na trawy: +

tyfikację zagęszczonych białek wykonywano metodą A-PAGE. Liofilizację roztworów oczyszczonych białek przeprowadzano przy użyciu liofilizatora FreeZone 2.5 Liter firmy Labconco.

Techniką testów punktowych skórnych wykonano serie badań ustalających reaktywność skóry badanych na różne stężenia ekstraktu, sposób filtrowania na sączkach (Millipore) oraz rodzaj roztworu, w którym rozpuszczono przygotowane liofilizaty (zbuforowany roztwór NaCl [PBS] oraz 0,15M kwas mlekowy). Ich wyniki przedstawia tabela II.

Ustalono, że wyniki reakcji immunologicznej pozwalające obiektywnie różnicować właściwości immunoreaktywne gliadyn są najlepiej widoczne przy stężeniu białka w roztworze 1000 µg/ml, w próbach przygotowanych bez filtrowania i rozpuszczonych w PBS. Wykonano serię testów optymalizacyjnych, których wyniki pozwoliły ustalić optymalne warunki ekstrakcji i przygotowania próby białka do testów skórnych. W badaniach testowano wpływ stężenia ekstraktu, sposób filtrowania na sączkach (Millipore) oraz rodzaj roztworu, w którym rozpuszczono przygotowane liofilizaty (zbuforowany roztwór NaCl [PBS] oraz 0,15M kwas mlekowy). W badaniach optymalizacyjnych uczestniczył pacjent wykazujący szerokie spektrum reakcji immunologicznej na różne alergeny. Ustalono, że wyniki reakcji immunologicznej pozwalające obiektywnie różnicować właściwości immunoreaktywne gliadyn są najlepiej widoczne przy stężeniu białka w roztworze 1000 µg/ml, w próbach przygotowanych bez filtrowania i rozpuszczonych w PBS (Tab. II).

Zgromadzone surowice wykorzystano w badaniach właściwości alergizujących gliadyn oraz pozostałych grup białek zapasowych pszenicy (LMW i HMW glutenin), a także indywidualnych, oczyszczonych frakcji gliadyn wyizolowanych z kompleksu białkowego metodą elektroforezy preparatywnej.

### Wyniki

Kliniczna analiza badanych chorych z podwyższonym poziomie sIgE dla glutenu wyłoniła dwie grupy osób. Dziewięć osób stanowiły chorzy z niezłym nosem oraz astmą, którym (w jednym przypadku) towarzyszyły objawy wyprysku powietrzno-pochodnego pojawiające się (lub nie) podczas zawodowego kontaktu z mąką, ustępujące po izolacji od kontaktu z pyłem mącznym co powodowało bezpośrednio złagodzenie objawów i stopniowe ich ustępowanie do 2-3 miesięcy. W trzech przypadkach badanie kontrolne po izolacji od pyłu mącznego wykazało obniżenie się poziomu sIgE dla mąki pszennej i glutenu w surowicy wraz z remisją objawów choroby (Tab. I) w następstwie izolacji od pyłu mąki. Remisję objawów obserwowano pomimo stałego stosowania przez chorych diety bez ograniczenia glutenu.

Drugą grupę pacjentów wyłonionych w trakcie badań stanowiło czterech chorych z rozpoznaniem ciężkich postaci przewlekłej pokrzywki z obrzękiem naczyń neruchomych (2 przypadki) oraz atopowego zapalenia skóry (2 przypadki), w których sam wywiad nie wykazywał jednoznacznie alergii na glu-

Tabela II

Wyniki testowania skórno (SPT\*) z wyciągami 5 frakcji białek gliadynowych 2 gatunków pszenicy (forma dzika – *Triticum* oraz forma uprawna – Finezja).

The results of skin tests (SPT) with extractions of 5 gliadin protein fractions of 2 species of wheat (wild sort *Triticum* and cultivated form – Finezja).

Lp.	Płeć	Wiek	Kontrola		Podfrakcje białek glutenowych				
			neg	poz	alfa	beta	gamma	omega5	omega 1,2
Grupa badanych									
1	M	52	0	5/20	4/15	0	0	4/10	3/15
2	M	28	0	4/15	3/20	0	0	5/35	3/15
3	M	58	0	6/20	0	0	0	3/5	3/5
4	M	38	0	4/6	0	0	0	3/20	5/15
5	M	52	0	5/20	5/20	0	0	3/10	3/20
6	M	58	0	5/15	5/20	0	0	3/15	3/5
7	K	35	0	3/10	3/10	0	0	2/4	0
8	K	48	0	5/20	0	0	0	2/3	2/4
Kontrola									
1	K	28	0	5/30	0	0	0	0	0
2	K	35	0	5/30	0	0	0	0	0
3	M	58	0	5/15	0	0	0	0	0
4	M	55	0	4/10	0	0	0	0	0

\*SPT- skómy test punktowy (średnica bąbla/rumienia w mm), kontrola neg-kontrola negatywna, kontrola poz-kontrola pozytywna (histamina).

ten, jednak dieta bezglutenowa miała wpływ na zmniejszenie objawów chorobowych.

Badania polimorfizmu białek gliadynowych techniką elektroforezy A-PAGE siedemnastu genotypów pszenicy wykazały silne zróżnicowanie składu frakcji elektroforetycznych w wszystkich pięciu grupach α, β, γ, ω-5 i ω-1,2 co – zgodnie z postawioną hipotezą – pozwalało oczekiwać istotnego zróżnicowania właściwości immunoreaktywnych wybranych odmian, rodów oraz dzikich gatunków pszenicy.

Ocena nasilenia reakcji wiązania przeciwciał IgE (asIgE dla glutenu) obecnych w surowicach badanych chorych przez kompleks białek gliadynowych poszczególnych genotypów pszenicy ocenianej testem ELISA wykazała znacznie niższą immunoreaktywność gatunków dzikich w porównaniu z odmianami uprawnymi pszenicy (Tab. II). Najniższą intensywność wiązania IgE stwierdzono w przypadku dzikiej, diploidalnej pszenicy *Triticum monococcum* – była ona o około 30% niższa w porównaniu z najbardziej immunoreaktywnym kompleksem gliadyn rodu Lad 480.

Identyfikacją najsilniej alergizujących frakcji w obrębie kompleksu gliadyn pszenicy uzyskanych przez rozdział preparatywny najbardziej immunoreaktywnych białek pszenicy (rodu Lad 480) uzyskano łącznie 15 frakcji reprezentujących wszystkie klasy białek gliadynowych (Ryc. 2). Ich immunoreaktywność badano testem ELISA z wykorzystaniem mieszaniny surowic czterech chorych. Najwyższe wartości gęstości optycznej (OD) stwierdzono dla frakcji ω-gliadyn. Immunoreaktywność frakcji ω-5 była wyższa od ω-1,2. Porównując natomiast frakcje w obu grupach ω z białkami w klasach α, β i γ gliadyn stwierdzono przeciętnie dwukrotnie wyższe wartości OD frakcji ω.

Immunodetekcja białek pszenicy metodą immunoblotingu po elektroforezie

SDS-PAGE przy użyciu surowic dwóch pacjentów, u których stwierdzono różne objawy chorobowe alergii na gluten, wykazała zróżnicowaną efektywność wiązania sIgE przez różne frakcje białkowe, przy czym w grupie białek o największej immunoreaktywności znalazły się: gliadyna o MW=45 kDa oraz podjednostka LMW gluteniny o identycznej masie cząsteczkowej. Nie stwierdzono natomiast wiązania sIgE wybranych chorych przez żadną spośród kilkunastu wyizolowanych frakcji białek nieglutenowych.

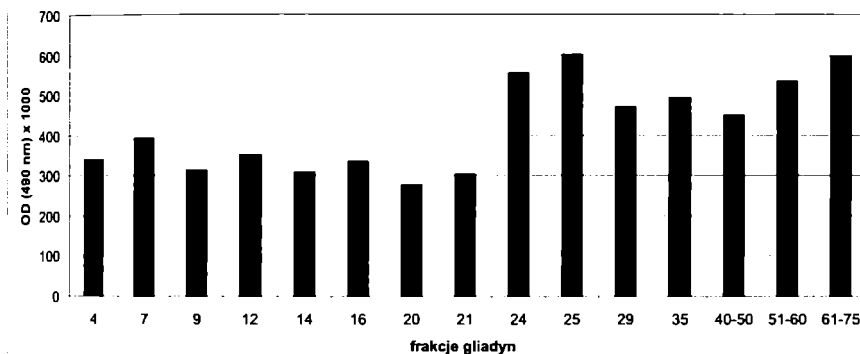
Właściwości immunoreaktywne kompleksu białkowego α, β i γ gliadyn z linii doświadczalnej pszenicy, z której usunięto na drodze genetycznej wszystkie frakcje z grupy ω-gliadyn (3xN) analizowana testem ELISA z wykorzystaniem indywidualnych surowic dziewięciu osób chorych. Uzyskane wyniki wykazały około 30% spadek zdolności wiązania sIgE na gluten linii 3xN w porównaniu z linią kontrolną zawierającą kompletny zestaw białek gliadynowych 3xC [26,30]. Wyniki badań *in vitro* potwierdziły badania wykonane techniką punktowych testów skórnych z udziałem 6 osób chorych i dwóch zdrowych (Tab. III). Średnice rumienia i bąbla w czterech na sześć rozpatrywanych przypadkach były zdecydowanie większe, gdy jako alergenu używano ekstraktów gliadyn kontrolnej linii pszenicy 3xN w porównaniu z „hipoalergiczną” linią pozbawioną ω-gliadyn – 3xN.

### Dyskusja

Od czasu opisanego asIgE dla glutenu w roku 1978 [28] zawodowa alergologia IgE-zależna na białka glutenowe praktycznie nie jest rozpoznawana. Być może jest to związane z brakiem dolegliwości z przewodu pokarmowego u chorych pomimo stosowania przez nich normalnej diety bez ograniczeń glutenu. Alergia zawodowa IgE zależna pracowników pozostających w kontakcie z

Tabela III  
Wyniki punktowych testów skórnych z gliadyną linii 3xC oraz 3xN.  
The results of skin prick tests with gliadin of 3x C and 3x N lines.

Badany pacjent	Kontrola ujemna		Kontrola dodatnia		3xC		3xN bez omega gliadyn	
	bąbel	rumień	bąbel	rumień	bąbel	rumień	bąbel	rumień
1	0	0	3x3	4x5	2x2	0	3x3	0
2	0	0	4x4	5x5	5x5	7x8	3x3	4x4
3	0	0	4x5	6x7	3x3	3x3	0	0
4	0	0	5x6	6x8	7x4	10x13	3x3	5x5
5	0	0	4x6	8x9	1x1	2x2	1x1	0
6	0	0	3x5	12x15	5x4	12x10	3x3	4x5
Kontrola 1	0	0	5x5	10x15	0	0	0	0
Kontrola 2	0	0	4x4	10x7	0	0	0	0



Rycina 2  
Immunoreaktywność frakcji białek gliadynowych rodzaju Lad 480 na podstawie testu ELISA z wykorzystaniem mieszaniny surowic 3 pacjentów.

Oznaczenia frakcji gliadyn (zgodnie z ryciną 1):  
alfa – frakcje nr 4 i 7

beta – frakcje nr 9, 12, 14, 16 i 20

gamma – frakcje nr 21 i 24

omega 5 – frakcje nr 25, 29, 35 i 40-50

omega 1.2 – frakcje nr 51-60 i 61-75.

Immunoreactivity evaluation of purified gliadin proteins from winter wheat genotype Lad 480 by ELISA. Pooled sera of three patients were used for immunodetection.

Description of gliadin fractions (according to figure 1):

alfa – fractions 4 and 7

beta – fractions 9, 12, 14, 16 and 20

gamma – fractions 21 and 24

omega 5 – fractions 25, 29, 35 and 40-50

omega 1.2 – fractions 51-60 and 61-75

pyłem mącznym (piekarzy, cukierników czy młynarzy). Z reguły jest utożsamiana z alergią na białka nieglutenowe (alfa amylazę). Tymczasem nie rozpoznanie IgE zależnej alergii zawodowej na gluten prowadzić może do naturalnego rozwoju choroby, a jej konsekwencją może być pojawienie się ostrych objawów alergii systemowej podczas kolejnych ekspozycji (WDEIA) o charakterze odczynu anafilaktycznego [15-23].

Ważnym, dostrzeżonym przez nas zjawiskiem i trudnym do jednoznacznej interpretacji jest fakt remisji objawów z dróg oddechowych i skóry u chorych po izolacji od pyłu mącznego pomimo stosowania przez nich diety bez ograniczeń glutenu jak i dostrzeżonego zjawiska spadku poziomu asIgE dla glutenu i mąki wraz z izolacją od ekspozycji zawodowej pyłu mącznego bez wykluczania pokarmów z mąki pszennej. Zjawisko to wymaga dalszych badań i obserwacji na większej grupie chorych. Podobne zjawisko tolerancji pokarmowej białka jaja kurzego obserwowano u chorych z pokrzywką

kontaktoową na tą substancję [30]. Wydaje się, że może się ono wiązać z odmienną drogą prezentacji substancji uczulającej. W przypadku ekspozycji zawodowej prezentacja alergenów białek glutenowych pszenicy miała miejsce przez błony śluzowe dróg oddechowych i skórę podczas gdy wnikanie tych alergenów do ustroju przez przewód pokarmowy było tolerowane.

W przypadku pozostałych 4 chorych objętych badaniem z IgE-zależną alergią na gluten z rozpoznaniem ciężkiej postaci przewlekłej pokrzywki z obrzękiem naczynioruchowym oraz atopowego zapalenia skóry istotnie pomocnym w leczeniu było wprowadzenie diety bezglutenowej. Należy także zauważyć iż w tych przypadkach obecna była u chorych alerggia IgE-zależna na pyłek traw, a reakcje krzyżowe z alergenami pokarmowymi w tym przypadku mogły mieć wpływ na rozwój objawów chorobowych o uporczywym przebiegu.

We wszystkich badanych przypadkach z IgE zależną alergią na białka glutenowe

nie wykazano wzrostu poziomu asIgE dla alfa amylazy. Wskazuje to, że alergii IgE-zależnej na gluten u badanych chorych nie towarzyszyła alerggia IgE-zależna na alfa amylazę. Wyniki te potwierdziły badania oparte na immunoblotingu, które wykazały brak immunodetekcji białek nieglutenowych pszenicy (do których należy również alfa amylaza) przez surowice osób uczestniczących w badaniu. Wskazuje to, że IgE-zależna alerggia na białka glutenowe i nieglutenowe pszenicy w niektórych przypadkach może przebiegać oddzielnie.

Gliadyny i gluteniny mają istotne znaczenie w żywieniu człowieka na całym świecie. Obie grupy białek są silnie polimorficzne zależnie od źródła ich pochodzenia. Różne ich podfrakcje zawarte w pożywieniu czy też w aerosolu powietrznym mogą indukować u człowieka różne postaci alergii IgE zależnej, w tym najbardziej groźnej anafilaksji związanej z białkami gliadynowymi, a zwłaszcza frakcją omega 5 gliadyny [31,32].

Badania medyczne i biochemiczne opisane przez różnych autorów wykazały, że wśród alergii zależnych od białek glutenowych najbardziej niebezpieczną dla zdrowia i życia człowieka są reakcje anafilaktyczne typu WDEIA wywoływane przez gliadyny ω-5 [16,17, 19,29,31]. Z innych chorób, w których alergenami są inne niż ω-5 frakcje białek glutenowych, często wymienia się pokrzywkę, astmę, atopowe zapalenie skóry, zapaście, czy obrzęk naczynioruchowy [24]. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań reaktywności różnych frakcji gliadyn pszenicy z surowicą badanych osób potwierdzają silną immunoreaktywność / alergogenność zwłaszcza gliadyn ω-5 [19,29,31,32]. Wskazują też na znaczny polimorfizm pszenicy jak i na różną reaktywność chorych.

Gliadyny i gluteniny – podstawowe składniki chemiczne glutenu – stanowią wysoce polimorficzną grupę białek zapasowych pszenicy. Dla osób uczulonych na gluten są one jednak alergenami wywołującymi różne formy alergii pokarmowych i alergii indukowanej przez aerosol zawierający alergeny glutenu. Uzyskane wyniki pozwalają twierdzić, iż badani chorzy wykazywali indywidualny/ różnicowany charakter wiązania swoistej IgE dla glutenu w stosunku do różnych frakcji białkowych glutenu (ω-gliadyn, alfa gliadyn, a także glutenin małowazosteczkowych).

Wyniki badań i opracowanych metod u chorych z IgE zależną alergią na gluten potwierdzają, że istnieje możliwość identyfikacji poszczególnych podfrakcji uczulających białek glutenowych pszenicy i indywidualnego doboru produktów spożywczych zależnie od ich uczulenia na poszczególne białka glutenowe. Istnieje też możliwość pozyskiwania odmian pszenicy pozbawionych np. najczęściej uczulających frakcji np. frakcji ω-5, bez konieczności wprowadzania do leczenia chorego diety pozbawionej wszystkich białek glutenowych. Zarysowuje się zatem możliwość indywidualnego doboru nie uczulającej formy pszenicy dla potrzeb żywienia chorych, u których dieta ma istotne znaczenie w leczeniu. Wybór odpowiedniej odmiany pszenicy byłby uzależniony od wy-

ników badań diagnostycznych obejmujących analizę właściwości immunoreaktywnych poszczególnych grup oraz frakcji białkowych specyficznych dla określonego genotypu pszenicy w reakcji z surowicą chorego.

Wydaje się, iż w chwili obecnej najbardziej optymalnym genotypem pszenicy przydatnym w żywieniu osób z alergią na gluten mogłaby być linia 3xN wytworzona w trakcie realizacji opisanych badań, a pozbawiona wszystkich frakcji białkowych z grupy  $\omega$ -gliadyn.

Wyniki badań wskazują, że u chorych, u których wywiad wskazuje, iż kontakt z pyłem mąki prowokuje objawy chorobowe dróg oddechowych lub objawy skórne winni być badani w kierunku alergii IgE zależnej na białka glutenowe i nieglutenowe mąki. Potwierdzenie alergii na te białka u chorych wymaga niezwłocznej izolacji od ekspozycji pyłu mąki pszennej bez konieczności zaleceń dietetycznych ograniczających glutenowe białka pożywieniu. Natomiast diagnostyka alergologiczna w przypadku chorych z przewlekłymi, opornymi w leczeniu pokrzywkami oraz AZS winna objąć badanie w kierunku alergii IgE zależnej na gluten, a jeśli to możliwe na wybrane, silnie alergizujące frakcje białek glutenowych (m.in. omega 5). W przypadku potwierdzenia tej alergii winna być wprowadzona dieta bezglutenowa lub dieta z wyłączeniem uczulających białek glutenowych przez okres kilku miesięcy. Równocześnie u tych chorych należy aktualizować rozpoznanie odnośnie indukcji u nich alergii na inne alergeny krzyżowo reagujące z alergenami glutenu np. aeroalergeny i alergeny pokarmów, które także winny być wyłączone z diety lub kontaktu z chorym.

Uzyskane wyniki dowodzą silnego zróżnicowania aktywności immunologicznej w obrębie kompleksu białek glutenowych (gliadyn i glutenin). Efektywność tworzenia kompleksów IgE-gliadyna/IgE-glutenina [31,33-36] jest w znacznym stopniu uzależniona od właściwości chemicznych frakcji białkowych, a także od indywidualnych cech organizmu chorego. Stwierdzona specyfika wiązania przeciwciał IgE z białkami glutenowymi może stanowić podstawę do badań nad identyfikacją alergenów uczulających danego chorego jak i zmianą sposobu jego żywienia poprzez wykorzystanie w produkcji środków spożywczych genotypów pszenicy pozbawionych silnie alergizujących frakcji białek zapasowych.

Jak wynika z badań nie cały kompleks białek glutenowych lecz tylko niektóre jego składniki białkowe mogą być czynnikami chorobotwórczymi u poszczególnych chorych w alergiach związanych z nietolerancją białek pszenicy. Indywidualna identyfikacja frakcji uczulających chorego może być pomocna w diagnostyce i leczeniu alergii [36-39]. Charakterystyczne elementy budowy chemicznej mają wpływ na właściwości alergizujące gliadyn i glutenin. Polimorfizm tych białek może mieć wpływ na zróżnicowanie właściwości alergizujących co daje podstawy do opracowania modelu pszenicy, której białka zapasowe byłyby tolerowane przez osoby uczulone na gluten.

Wyizolowane i oczyszczone, alergizujące frakcje białkowe mogą być wykorzystane

do produkcji testów diagnostycznych, mogą być także wykorzystane do wytwarzania hipoaergiczných genotypów pszenicy, selektywnie pozbawionych silnie alergizujących białek i tym samym mogłyby być użyteczne w żywieniu osób z nietolerancją glutenu w pokarmach.

Podsumowując z przeprowadzonych badań wynika, iż genetycznie uwarunkowany polimorfizm białek glutenowych, przede wszystkim gliadyn i LMW glutenin, może być powiązany ze zmiennością ich właściwości immunoreaktywnych określonych na podstawie reakcji z surowicą osób wykazujących objawy alergii na gluten. Zróżnicowanie profilu alergogenności u różnych pacjentów w zależności od składu frakcji i podjednostek białek glutenowych pozwala przypuszczać, iż badania immunologiczne kolekcji pszenic obejmujących różne gatunki, odmiany oraz linie doświadczalne poszerzonych o materiały doświadczalne pozbawione silnie alergizujących frakcji białkowych pozwolą w przyszłości na indywidualny, ukierunkowany dobór genotypu pszenicy dla potrzeb żywienia określonego pacjenta wykazującego nietolerancję w przypadku odmian komercyjnych.

#### Wnioski

1. Alergia IgE-zależna na gluten
  - objawia się niezyciem nosa, astmą oraz wypryskiem powietrzno pochodnym, indukowanymi ekspozycją pyłu mąki (zwykle zawodową) z remisją objawów choroby po izolacji od tej ekspozycji bez konieczności stosowania diety z ograniczaniem glutenu.
  - może być jednym z czynników przyczynowych w przewlekłej pokrzywce i AZS, w których wprowadzenie diety bezglutenowej pozwala na uzyskanie złagodzenia przebiegu choroby.
2. Alergii IgE-zależnej na gluten nie towarzyszy IgE-zależna alergia na alfa amylazę.
3. Rzadkie występowanie dolegliwości przewodu pokarmowego u chorych z IgE-zależną alergią na gluten jest przyczyną trudności w rozpoznawaniu tej postaci alergii.
4. Frakcje  $\omega$ -5 białek gliadynowych jak również  $\alpha$ -gliadyny o MW=43 kDa i podjednostka LMW glutenin o masie 45 kDa wydają się mieć najistotniejsze znaczenie w rozwoju IgE zależnej alergii na gluten.

#### Piśmiennictwo

1. **Beccari E:** De Bononiensi Scientiarum et Artium Institutio Academiae Commentarii II. De Frumento. Part I. 1745: 122-127.
2. **Sozinov AA, Poparella FA:** Genetic classification of prolamins and its use for plant breeding. *Ann Techn Agric.* 1980; 28: 229-245.
3. **Shewry PR, Tatham AS, Halford NG:** The prolamins of the Triticeae. *Seed Proteins.* 1999; 33-78.
4. **Tanabe S, Arai S, Yanagihara Y:** A major wheat allergen has a glin-gln-gln-pro motif identified as an IgE-binding epitope. *Bioch Biophys Res Commun.* 2001; 219: 290-293.
5. **Tanabe S:** Identification of wheat allergens. *Internet Symposium of Food Allergens* 2001; 3: 163-170.
6. **Daengsuwan T, Palosuo K, Phankingthongkum S:** IgE antibodies to  $\omega$ -5 gliadin in children with wheat-induced anaphylaxis. *Allergy* 2005; 60: 506-509.
7. **Simonato B, Pasini G, Giannattasio M:** Food allergy to wheat products: the effect of bread baking and in vitro digestion on wheat allergenic proteins. A study with bread dough, crumb and crust. *J Agric Food*

*Chem.* 2001; 49: 5668-5673.

8. **Zapatero L, Martinez MI, Alonso E, Salcedo G, Sanchez-Monge R. et al:** Oral wheat flour anaphylaxis related to wheat  $\alpha$ -amylase inhibitor subunit CM3 and CM16. *Allergy* 2003; 58: 956-960.
9. **Walusiak J, Hanke W, Górski P, Palczynski C:** Respiratory allergy in apprentice bakers: do occupational allergies follow the allergic march? *Allergy* 2004; 59: 442-450.
10. **Sanchez-Monge R, Garcia-Casado G, Lopez-Otin C, Armentia A, Salcedo G:** Wheat flour peroxidase is a prominent allergen associated with baker's asthma. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 1130-1137.
11. **Simonato B, Lazzari FD, Pasini G:** IgE binding to soluble and insoluble wheat flour proteins in atopic and non-atopic patients suffering from gastrointestinal symptoms after wheat ingestion. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1771-1778.
12. **Golonka A, Czarnobilska E:** Choroby związane z nietolerancją glutenu. *Alergol Immunol.* 2014; 11: 5-9.
13. **Obtulowicz K, Czarnobilska E, Chmielewska A, Rembiasz-Klimaszewska M:** IgE zależna alergia na gluten. *Alergol Immunol.* 2009; 6: 32-34.
14. **Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green http://www.biomedcentral.com/1741-7015/10/13; ins6PHR. et al:** Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med.* 2012; 10: 13.
15. **Kushimoto H, Aoki T:** Masked type I wheat allergy - relation to exercise-induced anaphylaxis. *Arch Dermatol.* 1985; 121: 355-360.
16. **Palosuo K, Varjonen E, Kekki OM:** Wheat  $\omega$ -5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108: 634-638.
17. **Morita E, Matsuo H, Mihara S:** Fast  $\omega$ -gliadin is a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci.* 2003; 33: 99-104.
18. **Lehto M, Palosuo K, Varjonen E, Majuri ML, Andersson U. et al:** Humoral and cellular responses to gliadin in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 90-95.
19. **Matsuo H, Morita E, Tatham AS:** Identification of the IgE-binding epitope in  $\omega$ -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Biol Chem.* 2004; 279: 12135-12140.
20. **Fischer J, Schuck E, Biedermann T:** Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis (WDEIA) exclusively during menstruation. *Allergy* 2010; 65: 1347-1348.
21. **Bouchez-Mahiou I, Snegaroff J, Tylichova M, Pecquet C, Branlard G, Lauriere M:** Low molecular weight gliatennins in wheat dependant, exercise-induced anaphylaxis: allelgenicity and antigenic relationships with omega 5-gliadins. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010; 153: 35-45.
22. **Barg W, Medrala W, Wolanczyk-Medrala A:** Exercise-induced anaphylaxis: an update on diagnosis and treatment. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2011; 11: 45-51.
23. **Gall H, Steinert M, Peter RU:** Exercise-induced anaphylaxis to wheat flour. *Allergy* 2000; 55: 1096-1097.
24. **Maruyama N, Ichise K, Katsube T, Kishimoto T, Kawase S. et al:** Identification of major wheat allergens by means of the Escherichia coli expression system. *Eur J Biochem.* 1998; 255: 739-745.
25. **Varjonen E, Kekki OM, Klemola T:** Wheat  $\omega$ -5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108: 634-638.
26. **Skoczowski A, Obtulowicz K, Czarnobilska E, Dyga W, Stachowicz M, Waga J:** Patient-dependent differentiation of gluten protein IgE-binding epitopes in wheat allergy. *Przeg Lek.* 2013; 70: 1043-1047.
27. **Bushuk W, Zillman RR:** Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. *Can J Plant Sci.* 1978; 58: 505-515.
28. **Baldo BA, Wrigley CW:** IgE antibodies to wheat flour components. *Clin Exp Allergy* 1978; 8: 109-124. *wg Food of Plant Origin ed. KabiPahmacia. Uppsala, 1993: 16-17.*
29. **Gliński W, Rudzki E:** Alergologia dla dermatologów. *Wyd. Czelej. Lublin, 2002: 375-378.*
30. **Matsuo H, Dahlström J, Tanaka A, Kohno K, Takahashi H. et al:** Sensitivity and specificity of re-

- combinant  $\omega$ -5 gliadin-specific IgE measurement for the diagnosis of wheat-dependent exercise induced anaphylaxis. *Allergy* 2008; 63: 233-236.
31. **Waga J, Skoczowski A:** Development and characteristics of  $\omega$ -gliadin-free wheat genotypes. *Euphytica* 2014; 195: 105-116.
  32. **Mameri H, Bouchez I, Pecquet C:** A recombinant  $\omega$ -gliadin-like D-type glutenin and an  $\alpha$ -gliadin from wheat (*Triticum aestivum*): two immunoglobulin E binding proteins, useful for diagnosis of wheat-dependent allergies. *J Agric Food Chem.* 2012; 60: 8059-8068.
  33. **Waga J, Obtulowicz K, Zientarski J, Czarnobilska E, Skoczowski A:** Purified wheat gliadin proteins as immunoglobulin E binding factors in wheat Mediated Allergies. *Am J Plant Sci.* 2011; 2: 476-483.
  34. **Varjonen E, Vainio E, Kalimo K:** Antigliadin IgE – indicator of wheat allergy in atopic dermatitis. *Allergy* 2000; 55: 386-391.
  35. **Battais F, Mothes T, Moneret-Vautrin DA, Pineau F, Kanny G. et al:** Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Allergy* 2005; 60: 815-821.
  36. **Waga J, Zientarski J, Obtulowicz K, Bilo B:** Flour quality and binding of immunoglobulin E by gliadin proteins of two winter wheat genotypes. *Pol J Food Nutr Sci.* 2006; 15: 305-310.
  37. **Tatham AS, Shewry PR:** Allergens in wheat related cereals. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1712-1726.
  38. **Jones SM, Burks AW:** The spectrum of allergic reactions to foods in Food Allergy. Ed. by Metcalfe DD, Samson HA, Simon RA. Blackwell Publishing. USA, Oxford-UK, Victoria-Australia, 2008: 101-108.
  39. **Waga J, Zientarski J:** Isolation and purification of individual gliadin proteins by preparative acid polyacrylamide gel electrophoresis (A-PAGE) for allergenic research. *Pol J Food Nutr Sci.* 2007; 57: 91-96.