# تأثیر بنزوپیرن بر خاصیت آلرژی‌زایی گرده‌های گیاه آفتابگردان

**زهرا بقایی فر[۱] و احمد مجد[۲*]**

**تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی**

**تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی**

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۴

## چکیده

بنزوپیرن (BaP) به‌عنوان بخش مهمی از ذرات خروجی اگزوز موتورهای دیزلی (DEP) است. این ذرات دارای خاصیت هم‌افزایشی و ازدیاد حساسیت در مقابل آلرژن‌های معمول هستند. هدف از این تحقیق روشن نمودن اثرات BaP، به‌عنوان بخش اصلی DEP، بر آلرژی‌زایی گرده‌های آفتابگردان است. بدین منظور، ابتدا کشت گیاهان آفتابگردان (واریته رکورد)، تحت شرایط گلخانه‌ای و تیمار روزانه آنها با محلولهای BaP ($gL^{-1}$ ۰/۰۴، ۰/۰۲، ۰۰۲/ ) انجام شد. عصاره گرده‌های جمع‌آوری‌شده، در بافر فسفات نمکی (PBS) تهیه شد. پس از حساس‌سازی خوکچه‌های هندی، توان آلرژی‌زایی گرده‌ها بوسیله تست پوستی، سنجش سطح IgE کل و تعیین تعداد ائوزینوفیل‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سنجش پروتئین کل عصاره‌های گرده‌ای با روش برادفورد انجام شد. الگوی باندهای پروتئینی گرده‌ای با روش الکتروفورز SDS-PAGE در گروه‌های مختلف گیاهان تیمارشده و شاهد مقایسه شدند. بررسی توان آلرژی‌زایی نشان داد که شدت واکنش‌های آلرژیک در گرده گیاهان تیمارشده با BaP به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافته است. در کلیه گروه‌های تیمارشده با BaP، مقدار پروتئین کل گرده‌ای افزایش یافت. مطالعه کیفی پروتئین‌های گرده‌ای نشان داد در گرده گیاهان تیمارشده با محلول $gL^{-1}$ ۰/۰۴ BaP باند پروتئینی kDa ۲۷ ناپدید شده و دو باند جدید kDa ۲۲ و ۱۹ تشکیل شد. اما در گیاهان تیمارشده با غلظت‌های پایین‌تر BaP تفاوتی بین الگوی پروتئین‌های گرده‌ای دیده نشد. به‌طوری‌که تنها باند پروتئینی kDa ۲۲ در گرده‌های تیمارشده با $gL^{-1}$ ۰/۰۴ BaP، طی مطالعات ایمونوبلات به شدت با آنتی IgE واکنش داد. نتایج نشان دادند که BaP می‌تواند باعث تشکیل پروتئین‌های جدید گردد، که می توانند به صورت آلرژن عمل کنند.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، آلرژی گرده‌ای، آلودگی هوا، ایمونوبلات، بنزوپیرن، پروتئین گرده‌ای

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۵۸۷۹۰۴۶، پست الکترونیکی: z_baghaeifar@pnu.ac.ir

## مقدمه

آلودگی هوای القاء شده بوسیله ذرات خروجی اگزوز موتورهای دیزلی (DEP) در کشورهای صنعتی و در حال توسعه معمول می‌باشد (۱۵، ۲۷، ۶۶). DEP شامل مخلوط پیچیده‌ای از ذرات بسیار ریزی است که کربن بنیادی و هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAH) ها و نیز آئروسل‌ها و ترکیبات آلی فرار از قبیل هیدروکربن‌ها را دربر می‌گیرد (۲۱، ۲۵). این ذرات در ایجاد بیماریهای تنفسی و آلرژیک نقش دارد (۴۲، ۴۴، ۴۷ و ۶۶)، بدین ترتیب که می‌توانند گرده را به صورت غیرمستقیم از طریق القاء استرس رشد روی گیاه یا مستقیم از طریق آلوده سازی بساک های گیاه یا طی پرواز گرده‌ها در هوا تحت تأثیر قرار دهند (۹، ۱۷ و ۲۰). PAHها تحت تأثیر فرایندهای طبیعی یا با واسطه انسان، مثلا از طریق احتراق سوخت‌های فسیلی آزاد سازی شده و در محیط زیست پراکنده می‌شوند (۶۴). بنزوپیرن (BaP) یک PAH پنج حلقه‌ای تیپیک است که محصول احتراق ناکامل یا سوختن

مواد آلی (حاوی کربن) مثل سیگار، گازوئیل و چوب است (۶۴) که در هوا و نیز در برخی منابع آبی یافت شده و به‌عنوان شاخص قرارگیری در معرض PAH محیطی است (۵۳). BaP مشابه دیگر PAHها، دارای توانایی انباشتگی در گیاهان، حیوانات و خاک‌هاست و بدلیل این انباشتگی، هرچه موجودات در زنجیره غذایی در جایگاه بالاتری قرار می‌گیرند، غلظت آن افزایش می‌یابد. BaP در انسان‌ها و حیوانات متابولیز شده و برخی متابولیت‌های سمی را تشکیل می‌دهد (۴، ۵، ۲۸، ۴۰ و ۶۴).

گیاه آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) از نظر گیاه‌شناختی به تیره مرکبان تعلق دارد. این تیره یکی از فراوان‌ترین تیره‌های گیاهان گلدار است و بیش از ۲۰۰۰۰ گونه دارد. اعضای این تیره در کل جهان پراکنش وسیعی دارند و بسیاری از جنس های آنها از نظر آلرژی‌زایی اهمیت زیادی دارند (۷ ، ۸). گیاهان مرکبان یکی از معمول‌ترین عوامل درماتیت‌های گیاهی با بیش از ۱۵۰ گونه شناخته شده از نظر خاصیت آلرژی‌زایی هستند. ظرفیت حساس‌سازی این گیاهان نسبتا بالاست و اغلب در افرادی مثل باغبان‌ها، کشاورزان و گل‌کاران دیده می‌شود که در معرض تماس‌های پیاپی و نزدیک با آنها هستند. حساسیت تماسی ناشی از گیاهان تیره مرکبان در بسیاری از نقاط دنیا گزارش شده است (۲۳، ۲۶، ۵۱، ۶۲ و ۶۵). بذرهای آفتابگردان می‌توانند واکنش‌های آنافیلاکسی شدیدی را در برخی افراد ایجاد کنند (۳۹). تست پوستی نسبت به دانه‌های تازه آفتابگردان مثبت می‌باشد (۳۰). آلرژی نسبت به گرده‌های آفتابگردان در افراد درگیر در فرآوری بذرهای آفتابگردان، افرادی که در نزدیکی مزارع زندگی می‌کنند، یا پس از خوردن عسل حاوی گرده‌های آفتابگردان مشاهده شده است (۱۱، ۳۲). چندین آلرژن، با وزن‌های مولکولی kDa ۳۹ و۳۲، ۲۸/۷، ۱۴/۴ از گرده‌های آفتابگردان و دانه‌های آن جداسازی شدند (۱۹، ۲۲). با وجود اینکه سایر محققان اثرات هم‌افزایشی DEP را بر برخی آلرژن‌های متفاوت نشان دادند (۱۴، ۴۷) و نیز چندین گزارش در مورد عملکرد هم‌افزایشی بر آلرژن‌های مایت و اوآلبومین وجود دارد (۳۵، ۳۶) اما هیچ گزارشی در مورد اثر BaP، به‌عنوان بخش اصلی DEP، بر آلرژی‌زایی گرده‌ای وجود ندارد. هدف این پژوهش، مشخص نمودن اثر BaP بر پروتئین‌های گرده‌ای و آلرژی‌زایی گرده‌ای در آفتابگردان به‌عنوان یک گیاه آلرژی‌زای نسبی است.

## مواد و روشها

**مواد گیاهی و تیمارها:** بذرهای گیاهان آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) واریته رکورد از تیره مرکبان در گروه‌های مختلفی در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه بوعلی سینا کاشته شدند. ۵۰ گلدان (به قطر ۳۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر) با ۳ کیلوگرم خاک کشاورزی حاوی حدود ۳۰٪ ماسه، ۵۰٪ لوم و ۲۰٪ هوموس پر شدند. گلدانها در ۵ گروه که هر یک شامل ۱۰ گلدان بودند تقسیم‌بندی گردیدند. هر گلدان حاوی ۲ دانه‌رست بود که تحت شرایط گلخانه‌ای نگهداری شدند. گروه‌های آزمایشی به صورت زیر دسته‌بندی شدند: گیاهان تیمارشده با محلول‌های بنزوپیرن در بافر فسفات نمکی (PBS) در سه غلظت ۱) $۰/۰۰۲ gL^{-1}$، ۲) $۰/۰۲ gL^{-1}$، ۳) $۰/۰۴ gL^{-1}$ بنزوپیرن در M PBS ۰/۰۱، ۴) گروه شاهد تیمارشده با M PBS ۰/۰۱ و ۵) گروه شاهدی که هیچ گونه تیماری بر روی آن اعمال نشده بود. تیمارها دو هفته قبل از گل‌دهی شروع شدند و تا سه هفته بعدی، طی گلدهی و نمو گرده‌ها ادامه یافتند. برای تهیه محلول‌های BaP، ۱/۲ گرم پودربنزوپیرن با ۳ لیتر PBS مخلوط شد (Sigma-Aldrich, UK).

برای بالا بردن حلالیت از دستگاه اولتراسونیک برای مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. سایر غلظت‌ها نیز از طریق رقیق سازی این محلول ساخته شدند. بخش‌های هوایی گیاهان مورد آزمایش (شامل برگ‌ها و جوانه‌های در حال نمو) با غلظت‌های مختلف محلول بنزوپیرن اسپری شدند، در

حالی که شاهدها با PBS اسپری گردیدند. هر گیاه به صورت روزانه تا ۵ هفته با حدود ۲۰ میلی‌لیتر از محلول‌های ذکر شده فوق تیمار گردید. پس از گلدهی، گرده‌ها به صورت جداگانه از گیاهان شاهد و تحت تیمار جمع‌آوری شدند. به‌منظور خالص سازی گرده‌ها از صافی (مش)های ۴۰-۳۰ µm استفاده شد و گرده‌ها تا زمان استفاده در ۷۶°C- نگهداری شدند.

**مطالعات پروتئینی:** برای آماده سازی عصاره‌های گرده‌ای، یک گرم از گرده‌های خالص شده به ۲۰ میلی‌لیتر بافر PBS ۰/۰۱ M اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴°C روی شیکر مخلوط شد و ۴۰ دقیقه در ۴°C سانتریفیوژ گردید. محلول شناور بدست آمده طی شب دیالیز گردید و برای استفاده بعدی در دمای ۲۰°C- نگهداری شد (۶۱). ارزیابی غلظت پروتئینی عصاره گرده‌ای به روش برادفورد (۱۹۷۶) انجام شد. استخراج پروتئین‌های محلول در بافر نمونه با حرارت دادن به مدت ۴-۳ دقیقه در دمای ۱۰ °C قبل از لود کردن انجام شد. ۹۰ µl پروتئین در هر چاهک ریخته شد.

ژل در بافر تریس-گلایسین ( pH ۸/۳) دستگاه الکتروفورز ران شده و با مارکر Bio-RAD (Power Pac Basic, USA)(Sigma, St. Louis, MO) پروتئینی شرکت Sigma کالیبره گردید.

**حیوانات:** از خوکچه‌های هندی حساس‌شده، به عنوان یک مدل آزمایشی استفاده شد. خوکچه‌های نر نژاد پیربرات (با سن ۱۰-۸ هفته) از مؤسسه سرم سازی رازی خریداری و به منظور حساس‌سازی با گرده‌های آفتابگردان تیمار گردیدند. حیوانات در اتاق مخصوص با دمای ۲۵ ±۲ °C نگهداری و با رژیم غذایی آزمایشگاهی تغذیه شدند. سپس در ۹ گروه شش‌تایی تقسیم‌بندی و با تزریق ۱۰۰عصاره گرده‌ای (حاوی حدود ۵۰µg پروتئین در بافر فسفات نمکی) شاهد و تیمارشده با غلظت‌های مختلف µl BaP حساس‌سازی شدند. همچنین سه غلظت BaP ۱) $gL^{-1}$ ۰/۰۰۲، ۲) $gL^{-1}$ ۰/۰۲ و ۳) $gL^{-1}$ ۰/۰۴ نیز به ۳ گروه از حیوانات تزریق گردید. یک گروه تنها PBS دریافت کرد و بر روی گروه دیگر تیماری اعمال نگردید. حساس‌سازی ۳ بار، هر ۱۰ روز یکبار انجام شد (۱۵، ۲۴).

**آزمون پوستی:** به‌منظور انجام آزمون پوستی از خوکچه هندی استفاده شد. عصاره گرده‌ای به روش Sheldon و همکاران (۱۹۶۷) از کلیه نمونه‌ها (شامل گروه‌های شاهد و تیمارشده با BaP) تهیه شد و آزمون پوستی انجام شد. هر حیوان با ۱۰۰ µl عصاره گرده‌ای رقیق شده با ۰/۰۵ M PBS، pH ۷/۴ و حاوی ۵۰ µg پروتئین مورد آزمایش قرار گرفت. کنترل منفی بافر فسفات نمکی و کنترل مثبت هیستامین هیدروکلراید (۱ mg/ml) بود (۲۴). واکنش‌های پوستی پس از گذشت ۱، ۸ و ۲۴ ساعت از آزمون پوستی بر اساس قطر هاله تورم اندازه‌گیری شدند.

**آزمونهای سرولوژیک:** خوکچه‌های هندی در آزمونهای سرولوژیک به‌کار برده شدند. نمونه‌های خونی بطور مستقیم از قلب، یک هفته پس از آزمون پوستی تهیه گردیدند (۳). سرم‌های تهیه شده تا زمان استفاده در ۷۶°C- نگهداری شدند. سرم حیوانات حساس‌شده گروه‌های شاهد و تحت تیمار BaP تحت سنجش IgE قرار گرفتند. IgE کل سرم از طریق بکارگیری روش ELISA ارزیابی شد. مقدار IgE کل سرم بر حسب نانوگرم در میلی‌لیتر با بکارگیری کیت استاندارد IgE خوکچه هندی (guinea pig specific ELISA kit, Serotec, UK.) اندازه‌گیری گردید. تغییرات تعداد سلول‌های خونی به‌ویژه ائوزینوفیل‌ها در گروه‌های شاهد و تحت تیمار، با دستگاه شمارشگر سلول‌های خونی (Sysmexk1000) در آزمایشگاه مرجع مرکز بهداشت همدان مورد مقایسه قرار گرفتند (۱۵، ۵۲).

**ایمونوبلاتینگ:** باندهای پروتئینی عصاره‌های گرده‌ای به روش الکتروفورز SDS- PAGE جداسازی شدند و بعد به مدت یک ساعت در ۲۵V به غشا PVDF ۰/۲ µm

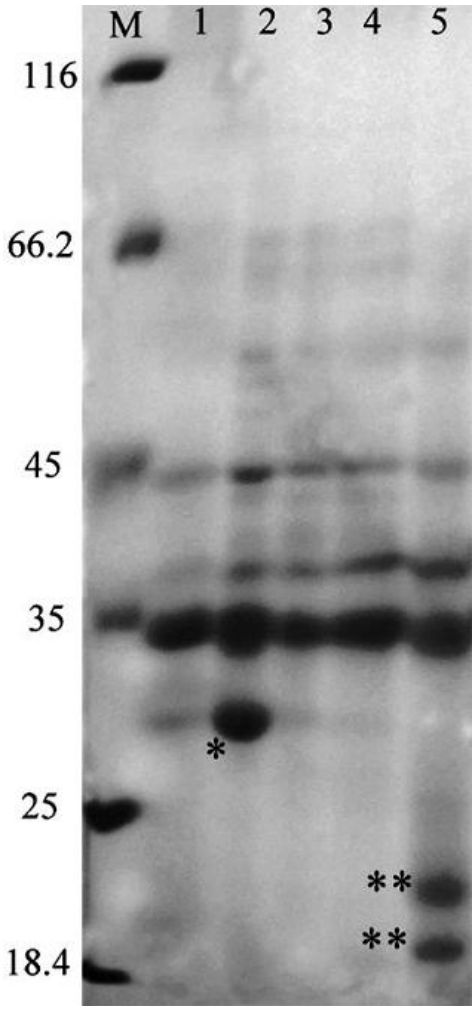
(Bio Rad, USA) انتقال یافتند (۵۷). غشاها طی شب در دمای ۴°C در مخلوط PBS، شیرخشک بدون چربی ۵٪ و $NaN_3$ ۰/۰۵ M بلاک شدند. سرم خون رقیق شده به نسبت ۱:۵ (V/V) در محلول حاوی PBS، شیرخشک بدون چربی ۱٪ و $NaN_3$ ۰/۰۱ M به غشا اضافه شد و طی شب در دمای ۴°C انکوبه گردید. سپس غشا به مدت ۲۰ دقیقه سه بار در PBS حاوی ۰/۱٪ Tween۲۰ شستشو داده شد (۱۸، ۵۴). در مرحله بعدی، سرم خوکچه‌های هندی در محلول بلاک به نسبت ۱:۷۰۰۰ رقیق شد و محلول به سرم اضافه گردید. محلول نهایی طی شب روی شیکر قرار داده شد. سپس غشا به مدت یک ساعت در محلول آنتی بادی IgG۱ پلی کلنال کانژوگه خوکچه هندی (Serotec, UK.) رقیق شده در Tween۲۰– ۰/۰۵٪ PBS به نسبت ۱:۳۰۰۰ قرار گرفت. در نهایت پس از شستشوی مجدد، غشا بوسیله روش کمولومینسانس ECL (Amersham Bioscience, USA) بررسی شد. باندهای آلرژن پس از یک دقیقه تماس با فیلم کداک OMAT-X آشکارسازی شدند (۶، ۵۹).

**تحلیل‌های آماری:** به‌منظور شناسایی تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد آزمایش، شاهدها و نیز بین گروه‌های آزمایشی مختلف، آنالیز واریانس (ANOVA) و LSD بین گروه‌های مورد مطالعه انجام شد (۱۶). هر یک از داده‌ها نشانگر میانگین ± SE، ۶ حیوان در گروه‌های مورد آزمایش و شاهد است.

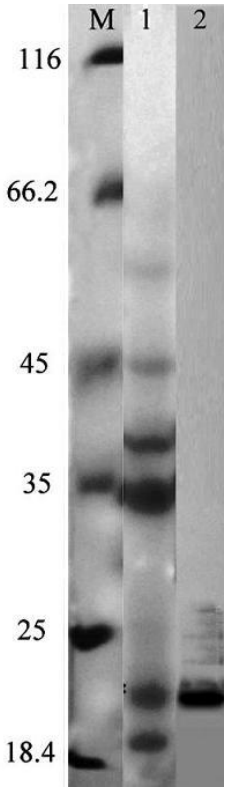
## نتایج

**آزمونهای پوستی و سرولوژیک:** نتایج آزمون پوستی (حداکثر قطر هاله تورم) نمونه‌های مختلف، پس از گذشت یک ساعت، در نمودار ۱ نشان داده شده است. ضمن انجام آزمون پوستی، بالاترین میزان حساسیت آلرژیک با میانگین قطر هاله تورم ۶ Cm در نمونه‌هایی دیده شد که با عصاره گرده‌های تیمارشده با BaP ۰/۰۴ $gL^{-1}$ حساس گردیدند. واکنش آلرژیک در گرده‌های شاهد با میانگین قطر هاله تورم ۳ cm نسبتا بالا بود. BaP در غلظت‌های متفاوت پتانسیل آلرژی‌زایی مؤثری نداشت و اثر آن در بالاترین غلظت، پایین‌تر از گرده شاهد اندازه‌گیری شد. آنالیز آماری نشان داد که اثر آلرژی‌زایی عصاره‌های گرده‌ای تیمارشده به میزان قابل توجهی بیش از عصاره‌های گرده‌ای شاهد و گروه حساس‌سازی نشده بود ($p\leq۰/۰۵$). بررسی اسمیرهای خونی نشان داد که در خوکچه‌های هندی حساس‌شده با عصاره‌های گرده‌ای تعداد ائوزینوفیل‌ها افزایش یافت. به نحوی که در خوکچه‌های هندی حساس‌شده با عصاره‌های گرده گیاهان تیمار شده با محلول BaP ۰/۰۴ $gL^{-1}$، تعداد ائوزینوفیل‌ها در حدود ۳–۲ برابر بیشتر از آنهایی بود که با عصاره‌های گرده گیاهان شاهد حساس‌سازی شدند و در عین حال ۱۰ بار بیشتر از گروه حساس‌سازی نشده بود (نمودار۲). اثربخشی محلول BaP ۰/۰۰۲ $gL^{-1}$ با توجه به رقیق بودن بسیار کمتر از دو محلول دیگر است. با افزایش غلظت به ۰/۰۲ $gL^{-1}$ تعداد ائوزینوفیل‌ها نسبت به گرده‌های گیاهان شاهد تا دو برابر افزایش یافت. در خوکچه‌های هندی حساس‌شده با محلول BaP افزایش چندانی از نظر تعداد ائوزینوفیل‌ها نسبت به نمونه‌های شاهد دیده نشد، و اثر این محلولها کمتر از ⅓ یا ¼ گرده‌های گیاهان شاهد هر دو واریته بود. PBS نیز که به صورت شم تزریق گردیده بود، در مقایسه با گروه بدون تزریق باعث افزایش تعداد ائوزینوفیل‌ها نشد. داده‌های مربوط به تعیین IgE کل در گروه‌های مختلف در نمودار ۳ نشان داده شدند. همه عصاره‌های گرده‌ای باعث افزایش سطوح IgE کل در خون حیوانات حساس‌شده گردیدند. سرم حیوانات حساس‌شده با عصاره‌های گرده‌ای تیمار نشده، دارای IgE کل بیشتری نسبت به حیوانات شاهد بود. نتایج نشان دادند که مقدار IgE کل در حیوانات حساس‌شده با عصاره‌های گرده‌ای تیمارشده با BaP در حد معنی‌داری افزایش یافت. آنالیزهای آماری نشان دادند که تفاوت بین حیوانات حساس‌شده با گرده‌های تیماری با BaP یا گرده‌های شاهد قابل توجه بود ($p\leq۰/۰۵$) (نمودار ۳).

**آنالیز پروتئینی:** نیمرخ باندهای پروتئینی حاصل از SDS–PAGE عصاره‌های گرده‌ای متفاوت (شاهد یا تیمارشده با غلظت‌های متفاوت BaP) در شکل ۱ نشان داده شده است.




شکل ۱- مقایسه نیمرخ الکتروفورزی پروتئین‌های گرده‌ای آفتابگردان در گروه گیاهان شاهد و تحت تیمار بنزوپیرن. M، مارکر پروتئینی؛ الگوی ۱، باندهای پروتئینی گرده‌های گیاهان شاهد بدون هیچ گونه تیماری؛ الگوی ۲، باندهای پروتئینی گرده‌های گیاهان تیمارشده با بافر فسفات نمکی؛ الگوی ۳، باندهای پروتئینی گرده‌های گیاهان تیمارشده با محلول ۰/۰۰۲ $gL^{-1}$ بنزوپیرن؛ الگوی ۴، باندهای پروتئینی گرده‌های گیاهان تیمارشده با محلول ۰/۰۲ $gL^{-1}$ بنزوپیرن؛ الگوی ۵، باندهای پروتئینی گرده‌های گیاهان تیمارشده با محلول ۰/۰۴ $gL^{-1}$ بنزوپیرن.




شکل ۲- نتایج ایمونوبلاتینگ سرم خون حیوانات حساس‌شده. M، مارکر پروتئینی؛ ستون ۱، باندهای پروتئینی گرده‌های گیاهان تیمارشده با محلول ۰/۰۴ $gL^{-1}$ بنزوپیرن؛ ستون ۲، باند آشکار شده پس از بررسی ایمونوبلاتینگ انجام شده در گرده‌های گیاهان تیمارشده با محلول ۰/۰۴ $gL^{-1}$ بنزوپیرن.

باندها در محدوده وزن مولکولی ۲۲ kDa و ۱۹ قرار گرفتند. الکتروفورز نشان داد که چندین پروتئین در گرده‌های تیماری با BaP وجود داشت که با باندهای مشاهده شده در گرده‌های شاهد متفاوت بودند. باندی با وزن مولکولی ۲۷ kDa در گرده‌های تیمارشده با محلول ۰/۰۴ $gL^{-1}$ BaP ناپدید شد و دو باند پروتئینی جدید ۲۲ kDa و ۱۹ در گرده‌های تیماری با BaP تشکیل گردیدند. سنجش پروتئینی نیز نشان داد که محتوی پروتئینی در همه گرده‌های تیمارشده با BaP افزایش یافت. البته افزایش قابل توجه و معنی‌داری در گروه تیمارشده با ۰/۰۴ $gL^{-1}$ BaP مشاهده گردید (جدول۱).

جدول ۱- محتوای پروتئینی عصاره‌های گرده آفتابگردان واریته رکورد در گروه‌های مختلف

| نوع نمونه | گرده گیاهان شاهد | گرده‌های شم (تیمارشده با PBS) | گرده‌های تیمارشده با BaP ۰/۰۰۲gL$^{-1}$ | گرده‌های تیمارشده با BaP۰/۰۲gL$^{-1}$ | گرده‌های تیمارشده با BaP۰/۰۴gL$^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| مقدار پروتئین (μg ml$^{-1}$) | ۱۵۷±۱۱ | ۱۶۰ ±۱۲ | ۱۶۳± ۱۵ | ۲۳۳±۱۷ | ۲۵۶± ۲۱ |

هر یک از داده‌ها نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار ۵-۳ نمونه است. تفاوت‌ها بین گروه گیاهان شاهد و تیمارشده با BaP معنی‌دار می‌باشد ($p\leq ۰/۰۱$).

**ایمونوبلاتینگ:** به‌منظور شناسایی آلرژن در سرم خون، ایمونوبلات عصاره‌های گرده‌ای انجام شد (شکل ۲). در حدود ۷ باند پروتئینی مجزا بوسیله رنگ‌آمیزی آبی کوماسی در گرده‌های تیمارشده با BaP ۰/۰۴ gL$^{-1}$ مشخص گردیدند. به‌منظور مشخص سازی باندهای آلرژن، باندهای متصل به IgE از طریق ایمونوبلات با بکارگیری سرم حیوانات حساس‌شده با عصاره گرده‌ای آفتابگردان آشکارسازی شدند. پس از ایمونوبلات، باندی با وزن مولکولی حدود ۲۲ kDa مشخص گردید (شکل ۲). واکنش شدیدی با همه سرم‌های خون حیوانات حساس‌شده دیده شد. البته تفاوت میان حیوانات حساس‌شده و شاهد معنی‌دار بود ($p\leq ۰/۰۵$). باند آلرژنی در عصاره‌های گرده‌ای شاهد و سایر گروه‌های آزمایشی قابل تشخیص نبود.

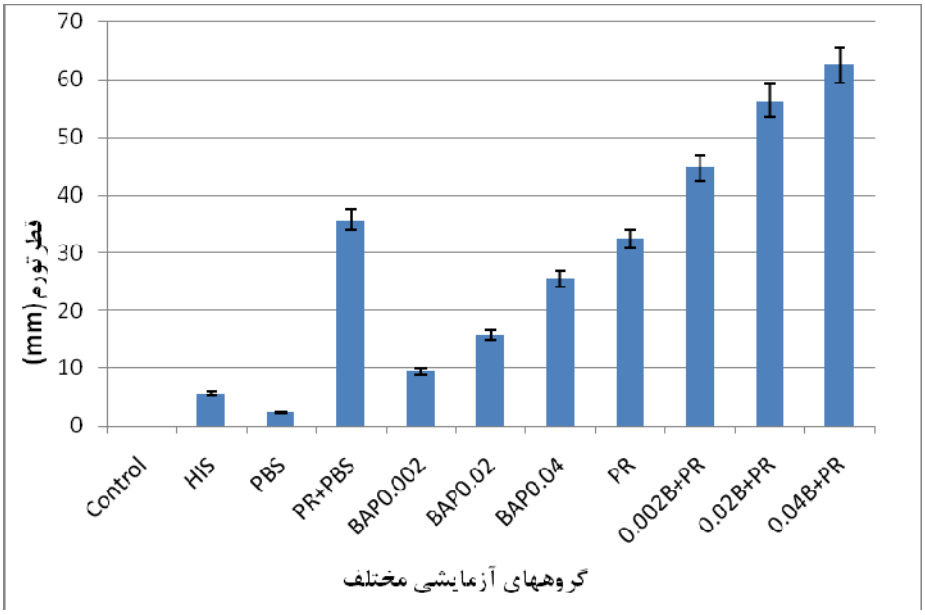
## بحث

آلاینده‌های هوا، به‌ویژه ذرات خروجی اگزوز موتورهای دیزلی (DEP) و اجزاء تشکیل‌دهنده آن از قبیل BaP دارای اثرات متفاوتی بر موجودات زنده هستند (۱،۲،۴، ۵، ۹، ۳۸). خروجی دیزل می‌تواند باعث افزایش واکنش‌های آلرژیک از قبیل رینیت و آسم گردند (۵۰). DEP دارای اثر هم‌افزایشی در مقابل آلرژن‌های معمول می‌باشد و نشانه‌های آلرژی را در افراد حساس‌شده افزیش می‌دهد (۱۵، ۲۷، ۲۹، ۳۴، ۳۷، ۴۹ و ۵۵). بر این اساس، پتانسیل آلرژی‌زایی گرده‌های تیمارشده و شاهد آفتابگردان به وسیله هاله تورم القاء شده از طریق آزمون پوستی، تغییرات در تعداد ائوزینوفیل‌ها و مقدار IgE کل در خون خوکچه‌های هندی، به‌عنوان یک مدل تجربی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمایش‌های سرولوژیک نشان دادند که تعداد ائوزنیوفیل‌ها، قطر متوسط هاله تورم و مقدار IgE کل خون در خوکچه‌های تیمارشده با عصاره‌های گرده‌ای بیشتر از گروه‌های شاهد بود (نمودارهای ۱، ۲ و ۳).

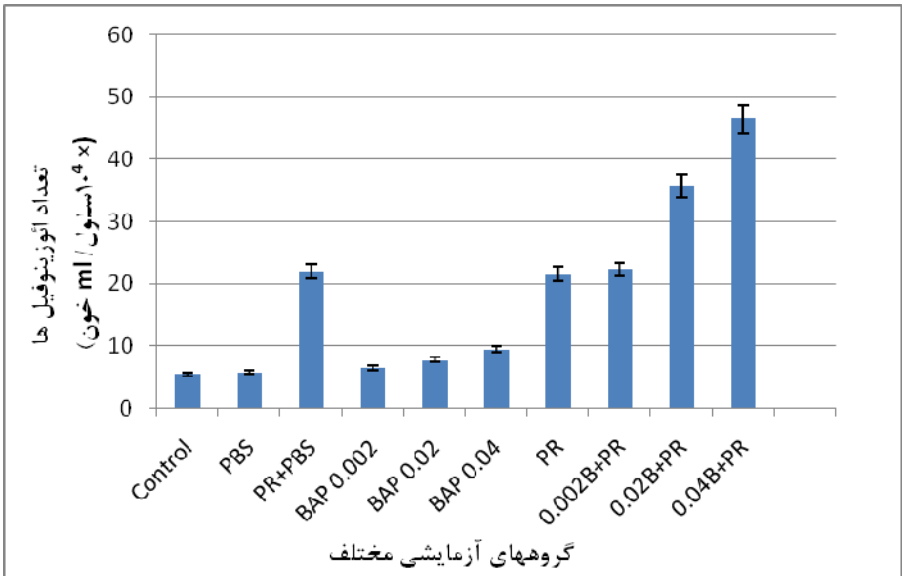
بر این اساس، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که آفتابگردان گیاهی آلرژی‌زاست. چنانکه آزمایش‌های قبلی نیز آلرژی‌زایی آفتابگردان را از طریق آزمونهای تنفسی نشان داده‌اند (۱۹، ۲۲). بدین ترتیب، این نتایج آشکارا نشان دادند که پتانسیل آلرژی‌زایی چنین گرده‌هایی زمانیکه با BaP تیمار شدند افزایش یافته است (نمودارهای ۱، ۲ و ۳). به‌عنوان نمونه، در گروه حساس‌شده با گرده گیاهان تیمارشده با BaP ۰/۰۴ gL$^{-1}$، تعداد ائوزینوفیل‌ها ۲/۵ برابر بیش از گروه حساس‌شده با گرده شاهد و در حدود ۵ بار بیش از گرده تیمارشده با BaP ۰/۰۴ gL$^{-1}$ بود.

این بدان معنی است که BaP به تنهایی نمی‌تواند باعث افزایش واکنش‌های آلرژیک گردد اما زمانیکه با گرده مخلوط می‌گردد به‌عنوان ادجوانت (افزایش دهنده) عمل می‌کند و باعث می‌گردد تا واکنش‌های آلرژیک به میزان قابل توجهی افزایش یابد. هر چند گزارش‌های زیادی مبنی بر اثر هم‌افزایشی DEP بر آلرژی‌زایی گرده‌ای وجود دارد (۱۴، ۱۵ و۴۴)، اما این تحقیق جدیدی در مورد اثر BaP، به‌عنوان بخش اصلی DEP، بر آلرژی‌زایی گرده‌ای است. به‌طوری‌که تنها گزارش‌های کمی مبنی بر عملکرد

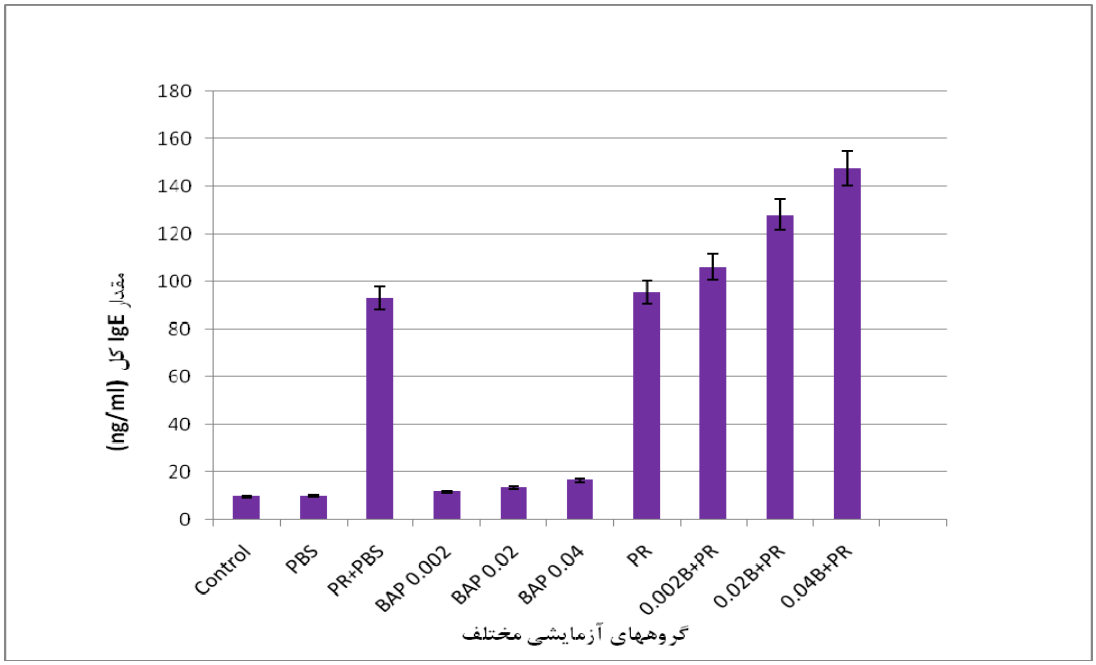
هم‌افزایشی BaP با آلرژن مایت و اوآلبومین تخم‌مرغ وجود دارد (۳۵، ۳۶).




نمودار ۱- مقایسه قطر هاله تورم آزمون پوستی در خوکچه‌های هندی تیمارشده با عصاره‌های گرده‌ای مختلف یا بافر فسفات نمکی. گروه‌های ۴-۱، به‌ترتیب شاهد، حساس‌شده‌ها با هیستامین هیدروکلراید ($1mg\ ml^{-1}$)، بافر فسفات نمکی و گرده‌های گیاهان تیمارشده با بافر فسفات نمکی؛ گروه‌های ۷-۵، حساس‌شده‌ها با محلول‌های بنزوپیرن در سه غلظت؛ گروه ۸، حساس‌شده با گرده‌های گیاهان شاهد؛ گروه‌های ۱۱-۹، حساس‌شده‌ها با گرده‌های گیاهان تیمارشده با غلظت‌های متفاوت محلول بنزوپیرن؛. هر ستون معرف میانگین داده‌ها ± انحراف معیار ۶ حیوان است. تفاوت بین گروه‌های مختلف در سطح احتمال $p\leq ۰/۰۵$ معنی‌دار است.




نمودار ۲- مقایسه تعداد ائوزینوفیل‌ها در خون خوکچه‌های هندی حساس‌شده با عصاره‌های گرده‌ای مختلف یا بافر فسفات نمکی. گروه‌های ۳-۱، به‌ترتیب شاهد، حساس‌شده‌ها با بافر فسفات نمکی و گرده‌های گیاهان تیمارشده با بافر فسفات نمکی؛ گروه‌های ۶-۴، حساس‌شده‌ها با محلول‌های بنزوپیرن در سه غلظت؛ گروه ۷، حساس‌شده با گرده‌های گیاهان شاهد؛ گروه‌های ۱۰-۸، حساس‌شده‌ها با گرده‌های گیاهان تیمارشده با غلظت‌های متفاوت محلول بنزوپیرن؛. هر ستون معرف میانگین داده‌ها ± انحراف معیار ۶ حیوان است. تفاوت بین گروه‌های مختلف در سطح احتمال $p\leq ۰/۰۵$ معنی‌دار است.




نمودار ۳- مقایسه مقدار ایمونوگلوبولین E (نانوگرم در میلی‌لیتر خون) در خون خوکچه‌های هندی حساس‌شده با عصاره‌های گرده‌ای مختلف یا بافر فسفات نمکی. اختصارات مشابه نمودار ۲ می‌باشد. هر ستون معرف میانگین داده‌ها ± انحراف معیار ۶ حیوان است. تفاوت بین گروه‌های مختلف در سطح احتمال $p \leq ۰/۰۵$ معنی‌دار است.

آنالیز IgE کل، نتایج مشابهی را نشان داد. در حیوانات تیمارشده با گرده‌های شاهد، مقدار IgE کل در حدود ۹۰ng/ml بود اما در گروه حساس‌شده با گرده‌های تیمارشده با BaP ۰/۰۴ $gL^{-1}$ این مقدار تا ۱۵۰ ng/ml افزایش یافت. سطح IgE کل در حیواناتی که تنها با BaP حساس شدند مشابه نمونه‌های شاهد بود. این بدان معنی است که BaP به‌عنوان یک آلرژن محسوب نمی‌شود اما می‌تواند باعث افزایش آلرژی‌زایی یک گرده آلرژن مثل آفتابگردان شود. آنالیز داده‌های حاصل از SDS– PAGE نشانگر تفاوت‌های قابل توجهی بین نیمرخ باندهای پروتئینی گرده‌های تیمار نشده و تیمارشده با BaP بود. تیمار با BaP باعث بیان پروتئین‌های جدید گرده‌ای شد (شکل۱). در گیاهان تیمارشده با بالاترین غلظت BaP، ۰/۰۴ $gL^{-1}$، باندی با وزن مولکولی ۲۷ kDa ناپدید شده و به جای آن دو باند جدید با وزن‌های مولکولی ۲۲ kDa و ۱۹ تشکیل شدند. تشکیل این پروتئین‌های جدید احتمالا به دلیل تیمار BaP است که می‌تواند با بیان ژنی جدید مرتبط باشد. با توجه به اینکه اثرات سمی بنزوپیرن قبلا گزارش شده است (۴، ۵، ۹، ۲۸، ۳۵، ۳۸، ۴۰، ۶۴)، این طور به نظر می‌رسد که پروتئین‌های جدید تشکیل شده می‌توانند به‌عنوان پروتئین‌های سم‌زدا باشند. این یافته‌ها با نتایج پژوهشگران قبلی ازجمله Chehregani و همکاران (۲۰۰۸) در مورد اثرات DEP همسو می‌باشد. برخی گزارش‌های قبلی نشان دادند که نیمرخ باندهای پروتئینی گرده‌های آفتابگردان شامل ۱۳ باند با وزن‌های مولکولی kDa ۹۴–۱۴/۴ می‌باشد (۱۹، ۲۲)، که با یافته‌های ما مبنی بر وجود ۷ باند با وزن‌های مولکولی kDa ۹۰–۱۹ متفاوت است (شکل۱). این طور به نظر می‌رسد که شرایط محیطی تأثیر قابل توجهی بر محتوای پروتئینی گرده‌ای دارند (۱۵)، یا این تفاوت به دلیل متفاوت بودن واریته‌ها یا تکنیک‌های بکار رفته در این مطالعات است (نتایج ما بیش از سه بار تکرار شدند). به‌منظور شناسایی باندهای آلرژن، باندهای اتصال یافته با IgE از طریق ایمونوبلات سرم خون حیوانات حساس‌شده با عصاره‌های گرده‌ای آشکارسازی

شدند. پس از ایمونوبلات، باندی با وزن مولکولی در حدود ۲۲ kDa در گرده‌های تیمارشده با BaP ۰/۰۴ $gL^{-1}$ مشخص گردید (شکل۲). گزارش‌هایی مبنی بر حضور باندهای آلرژن متفاوتی با وزن‌های مولکولی ۵۵ kDa و ۳۹، ۳۲ ،۲۸/۷، ۲۴، ۱۴/۴ در گرده‌های آفتابگردان شاهد وجود دارد (۱۹، ۲۲)، این نتایج از واریته‌های دیگر و طی مطالعات انسانی بدست آمده‌اند. بر پایه نتایج ما، باند آلرژن یک باند جدید است که تحت تأثیر تیمار BaP در واریته رکورد تشکیل شده است. مطالعات دیگری مطابق یافته‌های ما وجود دارد که نشان می‌دهند باندهای پروتئینی جدید در گروه قرار گرفته در معرض آلودگی تشکیل شده و به‌عنوان آلرژن جدید عمل می‌کنند. همه گرده‌های تیمارشده با BaP و شاهد می‌توانند باعث القاء واکنش آلرژیک شوند (نمودارهای ۱، ۲ و ۳). اما پروتئین آلرژن تنها در گروهی که با BaP ۰/۰۴ $gL^{-1}$ تیمار شدند، بوجود آمد و با روش ایمونوبلات قابل تشخیص بود. بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که مقدار پروتئین در گروه‌های تیمار نشده یا تیمارشده با سایر غلظت‌های BaP کمتر از آن است که به صورت باند آلرژن قابل تشخیص گردد. همچنین آنالیز پروتئینی نشان داد که محتوای پروتئینی از ۱۲۳ μg/ml در گروه تیمار نشده به ۳۴۷ μg/ml در گروه تیمارشده با بالاترین غلظت BaP افزایش یافت (جدول۱).

نتایج این پژوهش نشان داد که BaP، به‌عنوان بخش اصلی DEP، دارای اثرات قابل توجهی در افزایش پروتئین‌های گرده‌ای (آلرژن‌ها) و تشکیل پروتئین‌های جدید (آلرژن‌ها) می‌باشد. این اولین گزارش در مورد نقش BaP در ارتباط با آلرژی گرده‌ای است.

## نتیجه‌گیری

گزارش‌های متعددی وجود دارند که نشان داده‌اند آلاینده‌های هوا شامل DEP و ترکیبات شیمیایی موجود در آنها می‌توانند آلرژی‌زایی گرده‌ای را تحت تأثیر قرار دهند (۱۵، ۴۴ و ۴۷). نتایج این پژوهش نشان داد که آلرژی‌زایی در معرض BaP به میزان قابل توجهی افزایش یافته است. این بدان معنی است که BaP دارای اثر هم‌افزایشی نسبت به آلرژن‌های گرده‌ای است. نیمرخ باندهای پروتئینی و نیز مقدار پروتئین بوسیله BaP تحت تأثیر قرار گرفت و این طور به نظر می‌رسد که این مسئله با افزایش میزان آلرژی مرتبط باشد.

## منابع


۱- حافظی، م؛ نمکی شوشتری، ع؛ اسرار، ز؛ ترکزاده، م. (۱۳۸۸). تاثیرات غلظتهای سمی کادمیوم بر میزان گره زایی و تثبیت ازت سوشهای مختلف باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی (وحشی و دارای پلازمید) در گیاه یونجه. مجله زیست شناسی ایران. جلد۲۲، شماره ۴. ص ۶۲۶-۶۳۵.

۲- نورانی آزاد، ح؛ کفیل زاده، ف. (۱۳۹۰). تاثیر سمیت کادمیوم بر رشد، قندهای محلول، رنگریزه های فتوسنتزی و برخی آنزیمها در گلرنگ. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۴، شماره ۶. ص ۸۵۸-۸۶۶.

3- Aberg, N., 1989. Asthma and allergic rhinitis in Swedish conscripts. J. Clin. Exp. Allergy 19, 59–63.

4- Aina, R., Plain, L., Citterio, S., 2006. Molecular evidence for Benzo(a)pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L. Chemosphere 65, 666–673.

5- Alarcon, A., Delgadillo J., Franco-Ramirez A., Davies F., Ferrera-Cerrato R., 2006. Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and phytoremediation potential of Gigaspora margarita-Echynochloa polystachys symbiosis in Benzo(a)pyrene-polluted substrate. Revista Inter. de Contam. Ambiental 22, 39–47.

6- Arilla, M.C., Ibarrola, I., Puente, Y., Daza J.C., 2007. Cloning, expression and characterization of mugwort pollen allergen Artv2, a pathogenesis-related protein from family group1, Mol. Immunol. 44, 3653–3660.

7- Asturias, J.A., Arilla, M.C., Gomez-Bayon, N., Aguirre, M., Martinez, A., Palacios, R., Martinez J., 1998. Cloning and immunological

characterization of the allergen Hel a2 (profilin) from sunflower pollen. Mol. Immunol. 35, 469–478.

8- Atis, S., Tutluoglu, B., Sahin, K., Yaman, M., Kucukusta, A.R., Oktay, I., 2002. Sensitization to sunflower pollen and lung functions in sunflower processing workers. Allergy 57, 35–39.

9- Baghali, Z., Majd, A., Chehregani, A., Pourpak, Z., Ayerian, S., Vatanchian, M., 2011. Cytotoxic effect of benzo(a)pyrene on development and protein pattern of sunflower pollen. Toxicol. Environ. Chem. 93, 665– 677.

10- Behrendt, H., Becker, W.M., Friedrich, K.H., Ring, J., 1997. Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. J. Int. Arch. Allergy Immunol. 113, 69–74.

11- Bousquet, S., Dhivert, H., Clauzel, A., 1985. Occupational allergy to sun flower pollen. J. Allergy Clin. Immunol. 75, 70–74.

12- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72, 248–254.

13- Brun-Fahrlander, C., Ackermann-Liebrich, U., Schwartz, J., Gnehm, H.P., Rutishauser, M., Wanner, H.K., 1992. Air pollution and respiratory symptoms in preschool children. J. Am. Rev. Respir. Dis. 145, 42–47.

14- Chehregani, A., Majd, A., Moin, M., Gholami, M., Shariatzadeh, M.A., Nassiri H., 2004. Increasing allergy potency of Zinnia pollen in polluted areas. Ecotoxicol. Environ. Saf. 58, 267–72.

15- Chehregani, A., and Kouhkan, F., 2008. Diesel exhausts particles and allergenicity of pollen of *Lilium martagon*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 69, 569–73.

16- Chehregani, A., Malayeri, B.E., Kavianpour, F., Lari-Yazdi, H., 2006. Effect of acid rain on the development, structure, and viability of pollen in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). Pak. J. Biol. Sci. 9, 1033–1036.

17- Chehregani, A., Mohsenzadeh F., Hosseini, Sh., 2011. Effect of water soluble fraction of diesel exhaust particles on the development and protein patterns of pollen in *Phaseolus vulgaris* plants. Toxicol. Environ. Chem. 93: 526–536.

18- Cudowska, B, Kaczmarski, M, Restani, P., 2008. Lipid transfer protein in diagnosis of birch-apple syndrome in children, Immunobiol. 213, 89–96.

19- De La Hoz, F., Melero, J., A., Gonzalez, R., Carreira, J., 1994. Isolation and partial characterization of allergens from *Helianthus annuus* L. pollen. Allergy 49(10), 848–854

20- Emberlin, J., 1998. The effect of air pollution on allergic pollen. J. Eur. Respir. Rev. 53, 164–167.

21- EPA 1998. EPA-454/R-98-008. National Air Pollutant Emission Trends Procedures Document, 1900- 1996, US Environmental Protection Agency, May.

22- Fernandez, C., Martin, M., Fiandor, A., 1993. Analysis of cross-reactivity between sun flower pollen and other pollen of Compositeae family. J. allergy clin. Immunol. 92, 660–667.

23- Gordon l., 2002. Compositae dermatitis. Australasian J. Dermatol. 40, 123–130.

24- Gronelberg, D.A., Bielory L., Bonini W.U., 2003. Animal models of allergic and inflammatory conjunctivitis. Allergy 58, 1101–1113.

25- Hagemann, R., Virelizier, H., Gaudin, D., Pesneau, A., 1982. Polycyclic aromatic hydrocarbons in exhaust particles emitted from gasoline and diesel automobile. Toxicol. Environ. Chem. 5, 227–236.

26- Hausbn, B. M., Bheuer, J., Weglewski, J., Rucker, G., 2006. Peroxyachifolid and other new sensitizing sesquiterpene lactones from Yarrow (*Achillea millefolium* L.). Contact Dermatitis 24, 274–280.

27- Helander, M.L., Sarolainen, J., and Ahlholm, J., 1997. Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergen. J. Allergy 52, 1207–1214.

28- Henner, P., Schiavon, M., Druelle, V., Lichtfouse, E., 1999. Phytotoxicity of ancient gas work soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on plant germination. Organic Geochem. 30, 963–969.

29- Holt, P.G., Britten, D., Sedgwick, J.D., 1986. Suppression of IgE responses by antigen inhalation: studies on the role of genetic and environmental factors. J. Immunol. 60, 97– 102.

30- Hungness, S.I., Singer, A.M., Baldwin J.L., 2006. Sunflower seed allergy. J. Allergy Clin. Immunol. Abstract 184.

31- Hwang, B.F., Lee, Y.L., Lin, Y.C., Jaakola, J.J., Guo, Y.L., 2005. Traffic related air pollution as a

allergy in adult offspring mice. Allergy, Asthma Clin. Immunol. 6, 25–32.

43- Lowry O.H., Roseborough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–273.

44- Lubitz, S., Schober, W., Pusch, G., Effner, R., Klopp, N., Behrendt, H., Buters, J.T., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons from diesel emissions exert proallergic effects in birch pollen allergic individuals through enhanced mediator release from basophiles. Environ. Toxicol. 25, 188–197.

45- Majd, A., Ghanati, F., 1995. The effect of air pollution on the allergenicity of *Pinus elderica* (Pinaceae) pollen. Grana 34, 208–211.

46- Majd, A., Kiabi, S., 1997. The effect of Tehran's polluted atmosphere on ultrastructural changes and allergenicity of Cupressus arizonica pollen. J. Aerobiol. 13, 407–417.

47- Majd, A., Chehregani, A., Moin, M., Gholami, M., Kohno, S., Nabe, T., Shariatzade, M.A., 2004. The effects of air pollution on structures, proteins and allergenicity of pollen. Aerobiol. 20, 111-118.

48- Majd, A., Pourpak, Z., Moin, M., Sharif, SH M., 2008. Effects of air pollution on the structure and content the pollen shastadaisy (chrysan themum maximum (Ramond)

49- Matsuramara, Y., 1970. The effect of ozone, nitrogen oxide, and sulphur dioxide on the experimentally induced allergic respiratory disorder in guinea pigs. J. Am. Rev. Respir. Dis. 102, 430–444.

50- Mehiri Ben Rhoma, N., Louzir, B., Cherif, J., Daghfous, J., 2005. Respiratory effects of diesel exhaust emission. Tunis Med. 83, 127–131.

51- Michell, J.C., Dupuis, G., 2006. Allergic contact dermatitis from sesquiterpenoids of the compositae family of plants. British J. Dermatol. 84, 139–150.

52- Mondal, A.K., Parui, S., Biswas, S.R., Mandal, S., 1997. Identification of the allergenic proteins of Ipomoea fistulosa pollen: partial characterized and sensitivity test. J. Grana 36, 301–305.

53- Ono-Ogasawara, M., Smith, T., 2004. Diesel exhausts particles in the work environment and their analysis. Industrial Health 42, 389–399.

54- Radauer, C., Breiteneder, H., 2006. Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. J. Allergy Clin. Immunol. 117, 1141–1147.

determinant of asthma among Taiwanese school children. Thorax 60, 467–473.

32- Jimenez, A., Moreno, C., Martinez, J., Bartolome B., Guerra F., Palacios R., 1994. Sensitization to sunflower pollen: only an occupational allergy. Int. Arch. Allergy Immunol. 105, 297–300.

33- Ishizaki, T., Koizumi, K., Ikemori, R., Ishiyama, Y., Kushibiki, E., 1978. Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. J. Ann. Allergy 58, 265–270.

34- Ito, H., Shunkichi, B., Kazunori, M., 1996. The relationship between Japans cedar pollinosis and air pollutants deposited on the pollen. Aerobiol. 12, 37–42.

35- Kadkhoda, K., Pourpak Z., Pourfathallah, A.A., Kazemnejad, A., 2004. The ex vivo study of synergistic effects of polycyclic aromatic hydrocarbon, Benzo(a) pyrene with ovalbumin on systemic immune responses by oral route. Toxicol. 199, 261–265.

36- Kadkhoda, K., Pourfathallah, A.A., Pourpak Z., Kazemnejad, A., 2005. The cumulative activity of Benzo(a) pyrene on systemic immune responses with mite allergen extract after intranasal instillation and ex vivo response to ovalbumine in mice. Toxicol. Letters 157, 31–39.

37- Kainka-Stanicke, E., Behrendt, H., Frriedrichs, K.H., Tomingas, R., 1989. Surface alterations of pollen and spores by particulate air pollutants. J. Hyg. Environ. Med. 188, 509-516.

38- Kang, H.G., Jeong, S.H., Cho, M.H., Cho, J.H., 2010. Changes of biomarkers with oral exposure to benzo(a)pyrene, phenanthrene and pyrene in rats. J. Veterinary Sci. 8, 361–368.

39- Kelly, J.D., Hlywka, J.J., Heflet S.L., 2000. Identification of sunflower seed IgE-binding proteins. Int. Arch. Allergy Immunol. 121, 19–24.

40- Kummerov, M., Slovak, L., Holoubek, I., 1995. Phytotoxicity studies of Benzo(a)pyrene with Lactuca sativa. Toxicol. Environ. Chem. 51, 197–203.

41- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.

42- Lin, L., H. Zhu, C. Quan, G. Grunig, M. Ballaney, X. Jin, F.P. Perera, P.H. Factor, L.C. Chen, Miller, R.L., 2010. Prenatal allergen and diesel exhaust exposure and their effects on

55- Riedel, F., Kramer, M., 1988. The effects of SO2 exposure on allergic sensitization in the guinea pig. J. Allergy Clin. Immunol. 82, 527–534.

56- Ring, J., Behrendt, H., 1993. Role of infection and environmental pollution. Allergo J. 2, 27–30.

57- Robtom Jason, M., Teuber, S., Sathe, S.K., Roux, KH., 2002. Linear IgE epitope mapping on the English walnut (*Judlans regia*) major food allergen, Jug r1. J. Allergy Clin. Immunol. 109, 143–149.

58- Rusznak, C., Devalia, J.L., Davis, R.J., 1994. The impact of pollution on allergic disease. J. Allergy 49, 21–27.

59- Schmechel, D., Brett, J.G., Francoise, M.B., Janotka, E., Donald, H.B., 2008. Analytical bias of cross-reactive polyclonal antibodies for environmental immunoassays of *Alternaria alternate*. J. allergy clin. Immunol. 121, 163–768.

60- Shahali, Y., Majd, A., pourpak, z., Tajadod, G., 2007. Comparative study of the pollen protein contents in major varieties of *cupressus arizonica* planted in Tehran, Iran J. Allergy Asthma Immunol. 6, 123–127.

61- Shahali, Y., pourpak, z., Moin, M., Mari, A., Majd, A., 2009. Instability of the structure and allergenic protein content in Arizona cypress pollen. Allergy 64, 1773–1779.

62- Sharma, SC., Kaur, S., 1990. Contact dermatitis from compositae plants. Indian J. Dermatol. 56, 27–30.

63- Sheldon, J.M., Lovell, R.G., Mathews, K.P., 1967. A Manual of Clinical Allergy. WB Saunders, Philadelphia, PA.

64- Sverdrup, E.L., Hagen, B.S., Krogh, P.H., Van Gestel, C., 2007. Benzo(a)pyrene shows low toxicity to three species of terrestrial plants, two soil invertebrates, and soil-nitrifying bacteria. Ecotoxicol. Environ. Saf. 66, 362–368.

65- Wopfner, N., Gadermaier, G., Egger, M., Asero, R. 2005. The spectrum of allergens in Ragweed and Mugwort pollen. Int. Arch. Allergy Immunol. 138, 337–342.

66- Yokota, S., Ohara, N., Kobayashi, T., 2008. The effects of organic extract of diesel exhaust particles on ischemia/reperfusion-related arrhythmia and on pulmonary inflammation. J. Toxicol. Sci. 33, 1–10.

# Effect of benzo (α) pyrene on the pollen allergenicity of *Helianthus annuus* L.

**Baghaeifar Z.[1] and Majd A.[2]**

[1] **Biology Dept., Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran**

[2] **Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch of Islamic Azad University, Tehran , I.R. of Iran**

## Abstract

Benzo (a) pyrene (BaP) is an important part of diesel exhaust particles. Diesel exhaust particles have been shown to express adjuvant activity for sensitization upon common allergens. The aim of this research is to elucidate the effects of BaP, as a major part of DEP, on the sunflower pollen allergenicity. Sunflower plants were treated every day under greenhouse conditions with different concentrations of Benzo (α) pyrene (BaP) and allergenicity of the pollen extracts prepared in a phosphate buffer were compared by means of skin test, as well as analysis of blood eosinophil count and total IgE level in guinea pigs. Non-treated and BaP-treated pollen grains were studied by SDS-PAGE for BaP-induced changes in protein banding profiles and also allergen band(s) were detected by immunoblotting method. Results showed that allergenicity (inducing allergic symptoms) of the BaP-treated pollen grains was increased considerably although the non-treated are still effective too. In all of the treated groups with 0.04 $g.L^{-1}$ BaP, the total protein increased. SDS-PAGE showed that protein banding profiles of the pollen grains were changed, the band with molecular weight of 72 kDa disappeared and two new bands,19 and 22 kDa appeared in the BaP-treated. The plants treated with lower concentrations of 0.04 $g.L^{-1}$ BaP didn't show any difference with the control samples. Immunoblotting studies showed a band with molecular weight of 22 kDa in BaP-treated pollen that reacts strongly with anti-IgE, but there is not any similar band in the non-treated.

**Key words**: Air pollutants, Benzo (α) pyrene, *Helianthus annuus*, Immunoblotting, Pollen allergenicity, Pollen protein