

**JACEK WAGA****JERZY ZIENTARSKI**

Zakład Oceny Jakości i Metod Hodowli Zbóż, IHAR, Kraków

## Strategie wytwarzania genotypów pszenicy o obniżonej zdolności wywoływania alergii i celiakii\*

### Strategies for development of hypoallergenic wheat genotypes

Białka gliadynowe są ważnymi składnikami różnych środków spożywczych wytwarzanych z ziarna pszenicy a w konsekwencji odgrywają istotną rolę w żywieniu człowieka. Jednakże w przypadku osób z nietolerancją glutenową są one czynnikiem odpowiedzialnym za różne formy alergii pokarmowych, natomiast dla chorych na celiakię substancją toksyczną. Stanowi to poważny problem związany z jakością, zdrowiem i bezpieczeństwem żywności. Badano zróżnicowanie właściwości alergogennych gliadyn u wybranych odmian, rodów oraz linii mieszańcowych pszenicy ozimej. Na podstawie testu ELISA oraz punktowych testów skórnych określano intensywność reakcji immunologicznej wywoływanej przez analizowane ekstrakty białkowe. Zidentyfikowano szereg mieszańców zawierających specyficzne kombinacje gliadyn warunkowane chromosomami *1B* bądź *1D*, wykazujących obniżoną immunoreaktywność w stosunku do form rodzicielskich. Korzystne właściwości w porównaniu do odmian uprawnych zaobserwowano też w przypadku dzikich form pszenicy, przede wszystkim *Triticum monococcum* oraz *Triticum dicoccum*. Stwierdzone zróżnicowanie immunoreaktywności gliadyn w obrębie gatunków oraz linii mieszańcowych stwarza perspektywę wykorzystania metod stosowanych w genetyce i hodowli roślin w pracach nad wytwarzaniem genotypów pszenicy o obniżonych zdolnościach wywoływania alergii i celiakii.

**Słowa kluczowe:** gliadyny, celiakia, alergie

Gliadins are one of the most important components in many foodstuffs produced from wheat seed, so they play a significant role in the human diet. However, for people suffering gluten intolerance they may be strong food allergens and in the case of celiac patients – even toxic. This is a serious problem connected with food safety and quality. Immunoreactivity of gliadins extracted from chosen wheat genotypes (species, cultivars and hybrid lines) was investigated. Based on ELISA and skin prick tests binding of gliadin proteins with specific antigliadin antibodies as well as human sera containing IgE antibodies to gluten was analysed. Hybrid genotypes containing a unique composition of gliadins coded by chromosomes *1B* and *1D* were identified. They showed decreased immunoreactivity in comparison with parental forms. Similar effect was observed in the case of wild progenitors of common wheat:

\* Praca naukowa finansowana ze środków Ministra Nauki w latach 2004–2007 jako projekt badawczy zamawiany nr PBZ-KBN-097/P06/2003

*Triticum monococcum* and *Triticum dicoccum*. Differentiation of the analysed wheat species and lines in respect of immunoreactive properties suggest possibility of using genetics and plant breeding methods in production of new hypoallergic wheat genotypes.

**Key words:** gliadins, celiac, allergies

## WSTĘP

Białka gliadynowe są szczególnym przykładem substancji biochemicznych, których cechy korzystne i użyteczne łączą się z cechami niekorzystnymi, wręcz szkodliwymi dla zdrowia ludzi. Są one ważnym elementem strukturalnym glutenu, tym samym mają znaczący wpływ na właściwości wypiekowe mąki. Jako składnik wielu pokarmów odgrywają istotną rolę w żywieniu człowieka. Jednakże w przypadku osób uczulonych na gluten są silnym alergenem (wywołującym m.in.: astmę, atopowe zapalenie skóry, pokrzywkę, obrzęk naczynioruchowy czy alergię pokarmową) natomiast dla chorych na celiakię — substancją toksyczną (Bürk i in. 2001, Vissers i in. 2001, Rujner, 1993). Stanowi to poważny problem związany z jakością, zdrowiem i bezpieczeństwem żywności. Ranga problemu sprawia, że ograniczenie właściwości alergizujących gliadyn (podobnie jak innych grup białek ziarniaków pszenicy) stało się przedmiotem intensywnych badań o charakterze interdyscyplinarnym. Dotychczas wiodącą rolę w tych pracach odgrywały nauki medyczne i technologia żywności. Rozwój wiedzy na temat właściwości biochemicznych i sposobu dziedziczenia białek zapasowych pszenicy dał teoretyczne podstawy dla włączenia w krąg badań metod z zakresu genetyki i hodowli roślin.

Mimo istotnych różnic pomiędzy alergiami i celiakią oba typy zaburzeń stanu zdrowia są wynikiem nieprawidłowego funkcjonowania systemu immunologicznego.

W przypadkach alergii organizm osoby uczulonej wytwarza nadmierne ilości przeciwciał klasy IgE przeciwko białkom glutenowym pszenicy i ich analogom pochodzącym z ziarniaków żyta, jęczmienia czy owsa. Wiązanie antygenów z przeciwciałami powoduje uwolnienie histaminy (pochodna aminokwasu histydyny), której duże ilości zgromadzone są w bazofilach. Po wydostaniu na zewnątrz histamina, zwiększając przepuszczalność naczyń krwionośnych, w różny sposób uszkadza narządy organizmu (Czerwionka-Szaflarska i Muller, 2001).

Inny rodzaj aktywności immunologicznej białek zapasowych pszenicy występuje w przypadku celiakii. Biochemiczne aspekty rozwoju choroby są wciąż przedmiotem badań naukowych. Obecnie wiadomo, że istotne znaczenie w patogenezie celiakii odgrywa enzym transglutaminaza tkankowa (tTG), który modyfikuje krótkie peptydy powstałe w wyniku trawienia enzymatycznego białek gliadynowych w przewodzie pokarmowym powodując zamianę określonych reszt glutaminy na kwas glutaminowy (Green i Jabri, 2003). Tak zmodyfikowane peptydy są szczególnie efektywnie wiązane przez białka głównego układu zgodności tkankowej (typu HLA DQ2), a następnie rozpoznawane przez specyficzne dla gliadyn limfocyty T. Opisane reakcje inicjują procesy zapalne wywołujące typowe dla celiakii objawy, takie jak zanik kosmków czy uszkodzenie błony śluzowej jelita cienkiego (Mc Mowat, 2003).

Należy zaznaczyć, iż pewne grupy gliadyn są bardziej szkodliwe dla zdrowia pacjentów, inne mniej. Przykładowo, w celiakii najbardziej aktywne są lekkie frakcje  $\alpha$ -gliadyn natomiast jednym z ważniejszych alergenów są szybko migrujące w trakcie elektroforezy białka należące do grupy  $\omega$ -gliadyn (Kasarda, 1994, Palosuo i in., 2001). Z punktu widzenia struktur białkowych istotną rolę w patogenezie odgrywają krótkie, powtarzające się sekwencje aminokwasów pełniące funkcje epitopów, a więc regionów bezpośrednio wiązanych przez przeciwciała (De Ritis i in., 1988). Zbudowane są one głównie z reszt proliny i glutaminy. W przypadku alergii szczególnie aktywny jest pentapeptyd Gln-Gln-Gln-Pro-Pro natomiast w celiakii — dwa tetrapeptydy: Gln-Gln-Gln-Pro oraz Pro-Ser-Gln-Gln określane w literaturze anglojęzycznej terminem "toxic peptides".

Badania właściwości alergizujących gliadyn — podobnie jak innych grup białek zapasowych zbóż są młodą, choć intensywnie rozwijającą się dyscypliną nauki. Z uwagi na brak standardowych metod w ich ocenie często wykorzystuje się zmodyfikowane testy diagnostyczne stosowane w praktyce klinicznej. Zarówno alergie jak i celiakia są chorobami, których rozwój spowodowany jest nieprawidłowym funkcjonowaniem systemu immunologicznego. Dlatego wskaźnikiem aktywności biologicznej alergenu może być — między innymi — zdolność jego wiązania przez różne komponenty układu odpornościowego, takie jak przeciwciała przeciwko endomysium, gliadynie, transglutaminazie obecne w surowicy pacjentów, molekuły DQ-2 czy specyficzne dla glutenu linie komórek T (Zwolińska-Wcisło i Galicka-Latała, 2004; Shuo-Wang i in., 2005).

Celem niniejszej pracy było stwierdzenie czy białka gliadynowe różnych form pszenicy ozimej (gatunków, odmian, linii mieszańcowych) wykazują zróżnicowanie pod względem zdolności wiązania przeciwciał antygliadynowych w warunkach *in vitro*, w procesie symulującym odpowiedź immunologiczną organizmu pacjentów uczulonych na gluten.

## MATERIAŁ I METODY

### **Materiał roślinny**

Materiał badawczy stanowiły:

- formy uprawne — powszechnie znane odmiany i rody pszenicy ozimej,
- blisko spokrewnione biotypy gliadynowe, wytworzone z linii heterogenicznych potomstwa orkiszki odmiany Oberkumler Rotkorn i rodu LAD 480,
- dzikie gatunki pszenicy: *Tr. monococcum*, *Tr. dicoccum* oraz *Tr. beoticum*.

### **Ekstrakcja białek gliadynowych**

Białka gliadynowe ekstrahowano z mąki dwuetapowo. W pierwszej kolejności badane próby oczyszczano z białek nieglutenowych - albumin i globulin — 0,01 M roztworem NaCl w proporcji 1:10 (w/v) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu (10,000 rpm, 10 min) i usunięciu supernatantu do pozostałego w probówce osadu dodawano 70% roztwór alkoholu etylowego (również w proporcji 1:10) i mieszano z przez całą noc. Po ponownym odwirowaniu ekstrakty rozcieńczono w stosunku 1:10.000 i 1:100.000, i analizowano pod względem właściwości immunoreaktywnych.

### **Ocena właściwości immunoreaktywnych i alergizujących gliadyn**

Właściwości immunoreaktywne białek gliadynowych wybranych form pszenicy określono na podstawie testu ELISA. W badaniach wykorzystano dwa warianty tej metody: wariant bezpośredni („direct”) oraz pośredni („indirect”).

W pierwszym przypadku ekstrakty gliadynowe wprowadzano do studzienek mikrotitracyjnych (w ilości 100  $\mu$ L na studzienkę) i opłaszczano przez całą noc w temperaturze 4°C. Na drugi dzień ekstrakty usuwano, płytki płukano trzykrotnie roztworem PBST, a do studzienek wprowadzano królicze poliklonalne przeciwciała antygliadynowe skoniugowane z peroksydazą chrzanową (aga-hrp, rozcieńczenie 1:1000) (Sigma Co.), które inkubowano w temperaturze 36°C przez 1,5 godziny. W wyniku reakcji z substratem (fabrycznie przygotowany roztwór ortofenylendwuaminy) powstawał barwny produkt, którego intensywność wybarwienia określano przy użyciu czytnika testu ELISA. Wartości gęstości optycznej (OD) analizowanych prób interpretowano jako wskaźnik właściwości immunoreaktywnych badanych białek.

W układzie „indirect” ELISA płytki opłaszczano roztworem gliadyny analogicznie jak w układzie „direct”. Na drugi dzień do studzienek wprowadzano roztwór surowicy ludzkiej rozcieńczony w buforze PBST w stosunku 1:2. Surowice zawierające wysoki poziom przeciwciał klasy IgE przeciwko glutenowi uzyskano od pacjentów wykazujących objawy alergii pokarmowych. Po inkubacji (36°C, 1,5 godziny) nadmiar surowicy usuwano, a na jej miejsce wprowadzano koniugaty (przeciwciała typu „antihuman” skoniugowane z alkaliczną fosfatazą) rozcieńczone w stosunku 1:1000 i ponownie inkubowano w temperaturze 36°C przez 1,5 godziny. Jako substratu używano BCIP/NBT. Wynik reakcji immunologicznej określono na podstawie odczytu gęstości optycznej produktów analogicznie jak w układzie „direct” ELISA.

Właściwości alergizujące gliadyn określano na podstawie zmodyfikowanego testu skórniego (SPT). W praktyce lekarskiej służy on do wykrywania alergii oraz identyfikacji rodzaju alergenów wywołujących uczulenia u badanych pacjentów. Na powierzchnię nakłutego igłą naskórka nanosi się 1–2 kropel badanego roztworu. W efekcie wiązania przeciwciał obecnych w krwi na skórze pojawia się okrągła czerwona plama, której średnica jest miarą intensywności reakcji immunologicznej informując o stopniu uczulenia badanego pacjenta. Opisaną metodę dostosowano do oceny właściwości immunoreaktywnych gliadyn, które po rozpuszczeniu w 0,01 M kwasie mlekowym wykorzystano jako antygeny. Wielkość obserwowanych plam była, w niektórych przypadkach, porównywalna z odczynem fabrycznego standardu. W naszych badaniach, w których uczestniczyli pacjenci wykazujący silne objawy alergii, wynik testu interpretowano jako alergenicyzność badanego roztworu gliadyn.

### **Redukcja wiązań disulfidowych**

Wewnątrzłańcuchowe wiązania disulfidowe białek gliadynowych poddano redukcji przy użyciu systemu tioredoksyny, w skład którego wchodziły: tioredoksyna (0,3 mg/mL), enzym reduktaza tioredoksyny (0,3 mg/mL) oraz 25 mM NADPH (Kobrehel i in., 1992). Mieszaninę reakcyjną rozpuszczoną w buforze tris-HCl (pH = 7,9) inkubowano przez 30 minut w temperaturze 36°C. Uzyskane produkty reakcji analizowano pod względem właściwości immunoreaktywnych.

## WYNIKI

Immunoreaktywność siedemnastu odmian, rodów i gatunków pszenicy oszacowano na podstawie wartości OD produktów reakcji immunoenzymatycznej gliadyn z surowicą pacjentów wykazujących objawy alergii pokarmowych (tab. 1). Obliczono również wartości wskaźnika, który informował o ile procent wartości OD każdego z badanych genotypów różniły się od średniej wartości OD dla form uprawnych. Wykazano, że zróżnicowanie immunoreaktywności gliadyn u wybranych odmian i rodów pszenicy ozimej było stosunkowo nieznaczne. Natomiast gliadyny dwóch form dzikich: *Triticum monococcum* oraz *Triticum dicoccum* wykazywały zdecydowanie niższą (około 15% i 20%) zdolność wiązania przeciwciał surowicy w porównaniu do form uprawnych.

Tabela 1

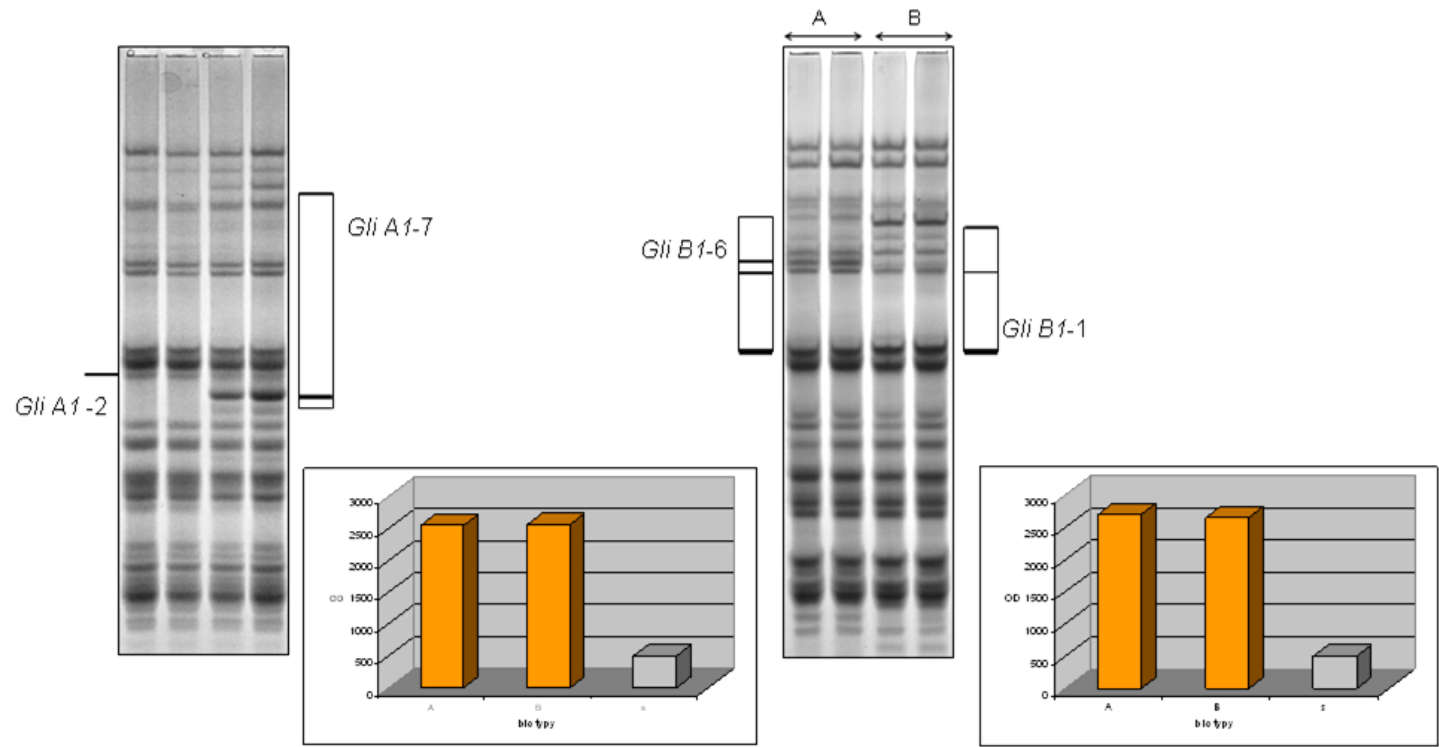
**Immunoreaktywność gliadyn w grupie wybranych form pszenicy**  
**Gliadin's immunoreactivity in the group of chosen wheat genotypes**

Lp. No.	Genotyp Genotype	OD*	I (%)**
1	Tonacja	2701	97,4
2	Sukces	2784	100,4
3	Jawa	2692	94,8
4	Elena	2781	100,3
5	Ostka strzelecka	2660	95,9
6	LAD 480	2965	96,9
7	Orkisz	2877	103,8
8	STH 146	2770	99,9
9	STH 626	2793	100,7
10	STH 650	2751	99,2
11	STH 764	2717	98,0
12	STH 5338	2849	102,7
13	<i>Tr. aethiopicum</i>	2714	97,9
14	<i>Tr. araraticum</i>	2627	94,7
15	<i>Tr. boeoticum</i>	2645	95,4
16	<i>Tr. dicoccum</i>	2379	85,8
17	<i>Tr. monococcum</i>	1985	81,6

\*OD — Gęstość optyczna; Optical density

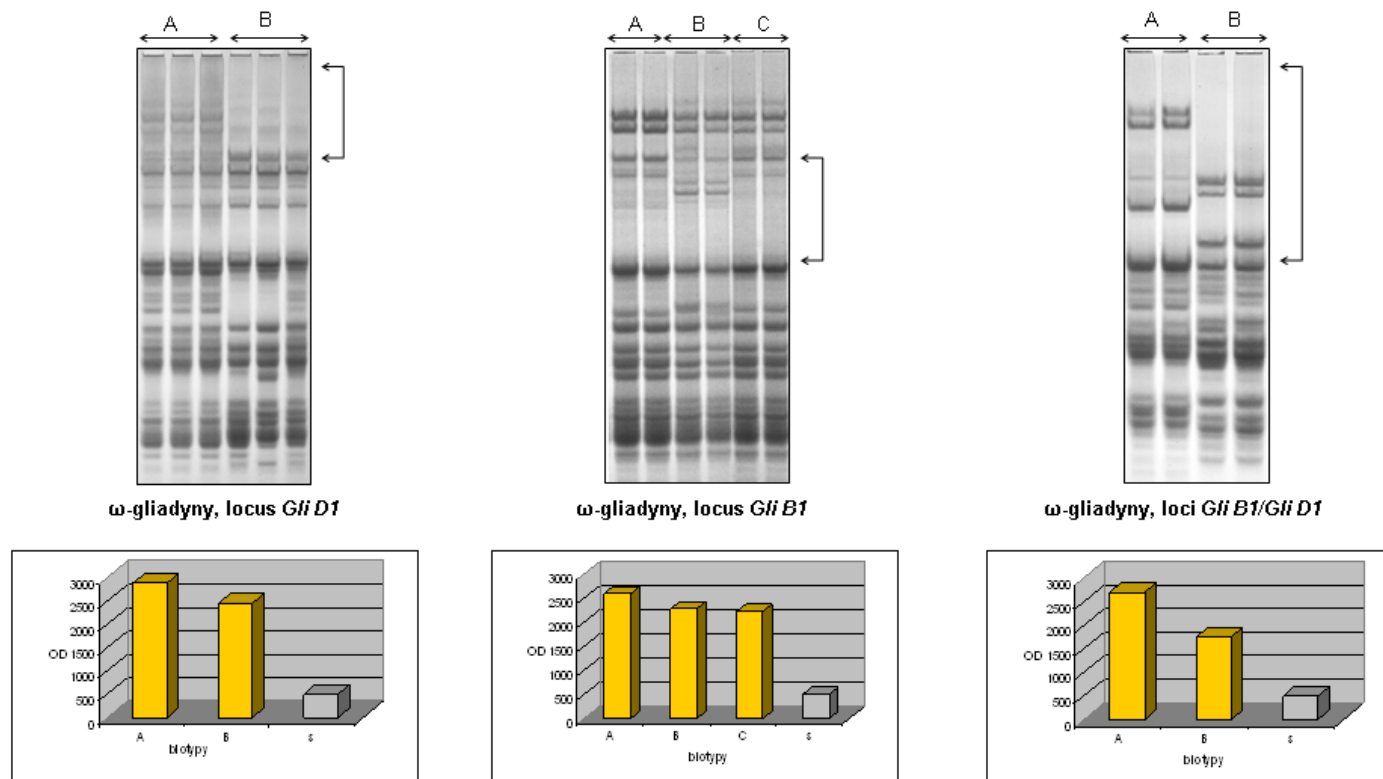
\*\*I (%) — Procent średniej wartości OD form uprawnych pszenicy; Percent of average OD value calculated for common wheat genotypes)

W odrębnym doświadczeniu porównywano parami blisko spokrewnione biotypy wytworzone z linii mieszańcowych orkiszu i rodu LAD 480. Biotypy w obrębie pary różniły się tylko jednym blokiem białek gliadynowych (rys. 1 a). Taki dobór materiału pozwala określić wpływ różnicującego bloku białkowego na zmienność badanej cechy. Porównanie wytworzonych linii mieszańcowych sugeruje, że frakcje powszechnie obserwowane wśród polskich odmian i rodów, nie różnicują analizowanych biotypów pod względem immunoreaktywności gliadyn.



Rys. 1 a. Obrazy elektroforetyczne oraz immunoreaktywność gliadyn w blisko spokrewnionych liniach mieszańcowych. A, B – biotypy gliadynowe s – ślepe próby

Fig. 1 a. Gliadin's electrophoregrams and immunoreactivity of closely related hybrid genotypes. A, B – gliadin biotypes. s – blanks

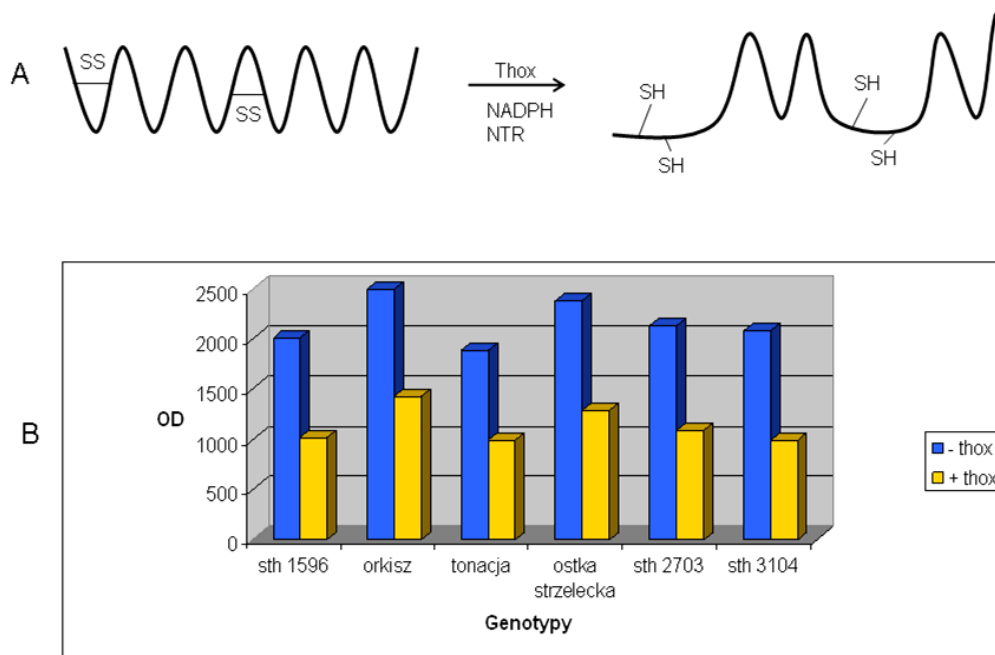


Rys. 1 b. Obrazy elektroforetyczne oraz immunoreaktywność gliadyn w blisko spokrewnionych liniach mieszańcowych. A, B – biotypy gliadynowe s – ślepe próby (kontynuacja 1 a)

Fig. 1 b. Gliadin's electrophoregrams and immunoreactivity of closely related hybrid genotypes. A, B – gliadin biotypes. s – blanks (continuation of 1 a)

W trakcie badań zidentyfikowano szereg genotypów zawierających specyficzne kombinacje prążków elektroforetycznych (rys. 1b). W ich przypadku stwierdzono wyraźnie słabsze wiązanie przeciwciał w porównaniu z biotypami stanowiącymi punkt odniesienia. Wartości OD dla tych genotypów były niższe przeciętnie o około 20%. Nietypowe kombinacje gliadyn obserwowano w grupach frakcji białkowych warunkowanych chromosomami 1B i 1D.

W punktowych testach skórnych gliadyny form dzikich oraz biotypów zawierających nowe kombinacje gliadyn również wykazywały nieco słabszy odczyn immunologiczny w porównaniu z typowymi odmianami uprawnymi.



**Rys. 2. Wpływ tioredoksyny na strukturę i właściwości gliadyn. A — Częściowe rozfaldowanie struktury drugorzędowej w wyniku redukcji wiązań SS. B — Obniżenie właściwości immunoreaktywnych gliadyn**

**Fig. 2. Influence of thioredoxin on structure and properties of gliadin proteins. A — Partially unfolding of secondary structure after reduction of SS bonds. B — Decreasing of gliadin's immunoreactivity**

Z kolei analizowano wpływ modyfikacji z wykorzystaniem tioredoksyny na właściwości immunoreaktywne gliadyn różnych form pszenicy. Tioredoksyna jest niskocząsteczkowym białkiem o właściwościach oksydoredukcyjnych, które w obecności enzymu — reduktazy tioredoksyny oraz NADPH redukuje wewnątrzłańcuchowe wiązania disulfidowe (SS) frakcji  $\alpha$ ,  $\beta$  oraz  $\gamma$ -gliadyn (Kobrehel i in., 1992). Zgodnie z hipotezą taka modyfikacja może łagodzić właściwości alergizujące białek, a z drugiej strony poprawiać właściwości wypiekowe mąki, gdyż częściowo rozfaldowane łańcuchy aminokwasów mają zdolność przyłączania się do wielocząsteczkowych molekuł gluteninowych za



pośrednictwem uwolnionych grup hydrosulfidowych (SH). Zwiększenie stopnia polimeryzacji zwiększa ich elastyczność (Wong i in., 1993). Celem weryfikacji tej hipotezy białka gliadynowe wybranych odmian uprawnych i rodów hodowlanych uzyskane metodą stopniowej ekstrakcji (a więc po ich wstępnym oczyszczeniu z albumin oraz globulin) poddano redukcji z wykorzystaniem systemu tioredoksyny. Immunoreaktywność uzyskanych produktów określono na podstawie testu ELISA zarówno w układzie „direct” jak też „indirect”. Wyniki badań w obu przypadkach wskazują na znaczny spadek immunoreaktywności białek (rys. 2). Wahał się on w granicach od 40 do 50% w stosunku do prób nie modyfikowanych, co oznacza, że zdolność wiązania przeciwciał antygliadynowych przez białka ziarniaków pszenicy o zmienionej, częściowo rozfałdowanej strukturze drastycznie zmalała. Sugeruje to, iż alergeniczność produktów spożywczych wytworzonych z mąki poddanej modyfikacji z wykorzystaniem systemu tioredoksyny może być również mniejsza, a sama metoda znaleźć komercyjne zastosowanie do produkcji żywności o właściwościach hipoaergicznymi, a więc niewywołujących niepożądanych reakcji organizmu w przypadku osób uczulonych na gluten.

Skuteczność tioredoksyny została stwierdzona również przez innych autorów (Buchanan i in., 1997). Uzyskane wyniki okazały się na tyle zachęcające, że w chwili obecnej bada się możliwości wytworzenia pszenicy o podwyższonej zawartości poszczególnych składników systemu jak również o podwyższonej efektywności funkcjonowania systemu tioredoksyny. Badania te prowadzone są zarówno z wykorzystaniem tradycyjnych metod hodowlanych, opartych na kombinacjach krzyżowań i selekcji mieszańców, jak również z wykorzystaniem linii transgenicznych uzyskanych metodami biologii molekularnej (Buchanan i in., 2001).

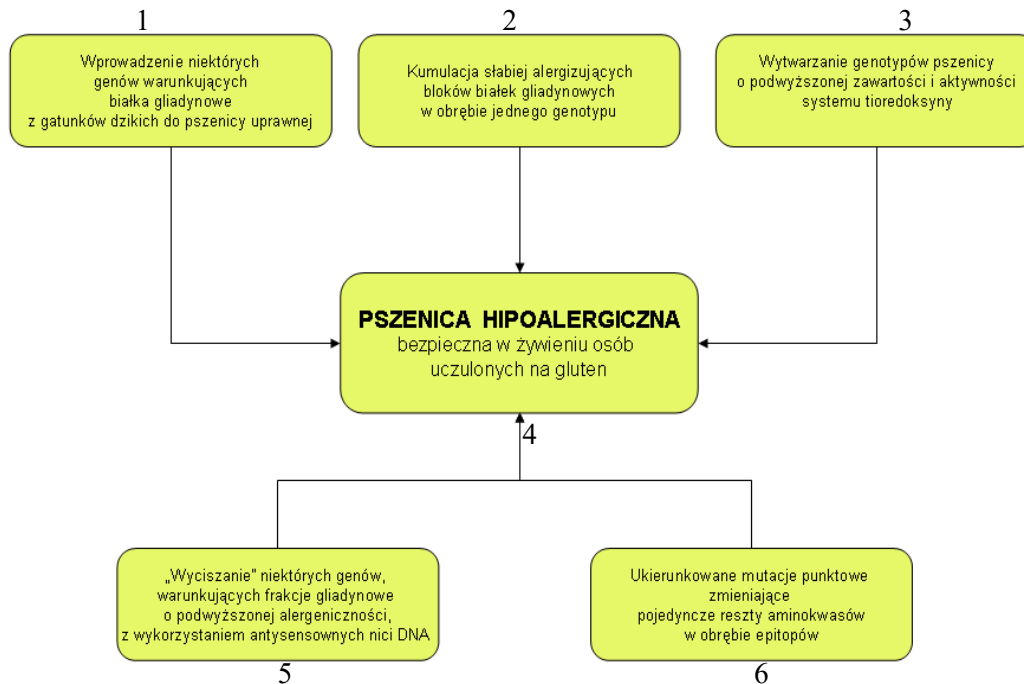
#### DYSKUSJA

Opisane przykłady ilustrują możliwość wytwarzania linii pszenicy zawierających gliadyny o obniżonej alergeniczności drogą:

- przeniesienia genów warunkujących białka gliadynowe z niektórych gatunków dzikich do pszenic uprawnych,
- identyfikacji, a następnie kumulacji w obrębie jednego genotypu słabiej alergizujących bloków białek gliadynowych warunkowanych różnymi chromosomami,
- identyfikacji genotypów o podwyższonej zawartości i efektywności systemu tioredoksyny.

Zakres metod nieomówionych, pozwalających uzyskać zbliżony efekt, jest z pewnością znacznie szerszy. Należałoby wspomnieć o możliwości wykorzystania technologii antysensownych nici DNA do wyciszania określonych genów warunkujących najbardziej toksyczne frakcje gliadyn, czy zastosowaniu ukierunkowanych mutacji punktowych pozwalających zmieniać pojedyncze aminokwasy w obrębie epitopów (Brown, 2001, Kuipers i in., 1997). Wydaje się jednak, że znacznie bardziej efektywnym podejściem byłoby zastosowanie strategii łączącej kilka wzajemnie uzupełniających się metod (rys. 3). Indywidualnie każda z nich może przyczynić się do obniżenia właściwości alergogennych,

lecz nie do ich eliminacji. Tymczasem obniżenie — nawet znaczne — jest niewystarczające z punktu widzenia norm żywnościowych. Przykładowo, górna granica stężenia gliadyny w produktach bezglutenowych, dopuszczalna przez Codex Alimentaris wynosi 200 ppm (Codex Stan., 1981). Trudno przypuszczać, aby zastosowanie którejkolwiek z wymienionych metod pozwoliło obniżyć immunoreaktywność gliadyn do poziomu, którego efekt byłby porównywalny z efektem działania śladowych ilości białka o stężeniu 200 ppm. Można natomiast oczekiwać, że połączenie kilku takich metod pozwoliłoby w znacznie większym stopniu osiągnąć pożądany rezultat.



- 1 — Introduction of some genes coding gliadin proteins from wild species to the cultivated wheat
- 2 — Accumulation of low-allergenic gliadin protein blocks within a single genotype
- 3 — Production of wheat genotypes with higher concentration and activity of the thioredoxin system
- 4 — **HYPOALLERGENIC WHEAT** safe in nutrition of humans allergic to gluten
- 5 — “Silencing” of some genes coding high-allergenic gliadin fractions with the use of antisense DNA strands
- 6 — Targeted point mutations changing single amino acid residues within the epitopes

**Rys. 3. Strategia wytwarzania genotypów pszenicy hypoalergicznej**  
**Fig. 3. Strategy of developing hypoallergenic wheat genotypes**

Należy wziąć pod uwagę, iż w przypadku białek glutenowych nie można wyeliminować wszystkich polipeptydów (nawet gdyby takie rozwiązanie było teoretycznie możliwe), ponieważ w efekcie właściwości wypiekowe uległyby drastycznemu pogorszeniu, co byłoby niezgodne z założeniami badań.

Należy także pamiętać, iż poza gliadynami w ziarniakach pszenicy są jeszcze inne grupy białek alergizujących, zarówno glutenowych jak i nie glutenowych. Nie została w sposób jednoznaczny wyjaśniona rola glutenin w rozwoju choroby zarówno tych

o niskiej, jak i o wysokiej masie cząsteczkowej (Anderson i Wieser, 2006). Zdania na ten temat są podzielone. Wiadomo natomiast, że w niektórych przypadkach bardzo silnymi alergenami są albuminy i globuliny (Ikezawa i in., 1994). Jest to obszerne zagadnienie i problem, który powinien być rozwiązany na drodze do wytworzenia hipoaergiczych genotypów pszenicy.

Niemniej jednak stwierdzenie różnic odmianowych i gatunkowych pod względem immunoreaktywności gliadyn oznacza, iż metody stosowane w genetyce i hodowli roślin, nawet te najbardziej tradycyjne, oparte na krzyżowaniach i selekcji, wspomagane testami biochemicznymi oraz klinicznymi, mogą odegrać kluczową rolę w procesie ograniczania lub eliminacji niekorzystnych, toksycznych cech białek zapasowych pszenicy.

#### LITERATURA

- Bürk K., Melms A., Schulz J. B., Dichgans J., Effectiveness of Intravenous Immoglobulin therapy in cerebellar ataxia associated with gluten sensitivity. *Ann. Neurol.*, 2001, 50 (6), 827 — 828.
- Brown T. A. 2001. *Genomy*. Wydawnictwa Naukowe PWN. Warszawa: 85 — 110.
- Buchanan B., Adamidi C., Lozano R. M., Yee B. C., Momma M., Kobrehel K., Ermel R., Frick O. L. 1997. Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol 94: 5372 — 5377.
- Buchanan B., Kobrehel K., Yee B. C., Lozano R., Frick O. L., Ermel R. 2001. Neutralization of food allergens by thioredoxin. U.S. patent No. 6,190,723 B1.
- Czerwionka-Szaflarska M., Muller L. 2001. Alergiczne podłoże chorób przewodu pokarmowego. *Ter. i Leki* 51 (4): 15 — 18.
- De Ritis G., Auricchio G., Jones H. H., Lew E. J. L., Bernardin J. E., Kasarda D. D., *In vitro* (organ culture) studies of the toxicity of specific A-gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*, 1988, 94, 41 — 49.
- Green P.H.R., Jabri B. 2003. Celiac disease. *Lancet* Vol. 362: 383 — 391.
- Ikezawa Z., Tsubaki K., Yokota S. 1994. Effect of hypoallergenic wheat (HAW-A1) on atopic dermatitis (AD) with wheat allergy, and its antigenic analysis using sera from patients with AD. *Acta Derm. Venerol.* 43(6):679 — 688.
- Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission. Codex Stan, 1981: 118.
- Kasarda D. D. 1994. Toxic cereal grains in celiac disease. Conleth Feighery and Cliona O'Farrelly Editors, *Proceedings of the Sixth International Symposium on Celiac Disease held at Trinity College, Dublin in July 1992*: 203 — 220.
- Kobrehel K., Wong J. H., Balogh K., Kiss E., Yee B. C., Buchanan B. B. 1992. Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. *Plant Physiol.* 99: 919 — 924.
- Kuipers A. G. J., Jacobsen E., Visser G. F. 1997. Applications of antisense technology in plants. *in: Antisense technology: a practical approach*. Lichtenstein C., Nellen W. (eds.) IRL Press at Oxford University Press: 191 — 219.
- Mc Mowat A. 2003. Coeliac disease — a meeting point for genetics, immunology and protein chemistry. *Lancet*, Vol. 361: 1290 — 1292.
- Palosuo K., Varionen E., Kekki O. M., Klemola T., Kalkkinen N., Alenius H., Reunala T. 2001. Wheat  $\omega$ -5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *J. Allergy Clin. Immunol.* Vol.108, No.4:634 — 638.
- Rujner J. 1993. Celiakia — postacie kliniczne i rozpoznawanie. *Klinika*, Vol. 2, No. 4 (8): 24 — 26.
- Shou-Wang Q., Bergseng E., Molberg Q., Jung G., Fleckenstein B., Sollid L. M. 2005. Refining the rules of gliadin T cell epitope binding to the disease-associated DQ-2 molecule in coeliac disease: importance of proline spacing and glutamine deamidation. *J. Immunol.* 175: 254 — 261.
- Wong J. H., Kobrehel K., Nimbona C., Yee B. C., Balogh A., Kiss F., Buchanan B. B. 1993. Thioredoxin and bread wheat. *Cereal Chem.* Vol. 70, No. 1: 113 — 114.

- Vissers M., Doekes G., Heederik D. 2001. Exposure to wheat allergen and fungal  $\alpha$ -amylase in the homes of bakers. *Clin. Exp. Allergy* Vol. 31: 1577 — 1582.
- Zwolińska-Wcisto M., Galicka-Latała D. 2004. Celiakia u dorosłych: rozpoznanie, obraz kliniczny, leczenie. *Alergologia, Immunologia*. 2, 2/3: 44 — 47.