

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Vedran Ostojić

***Promjene razine izotipova specifičnih
imunoglobulina u atopičara i zdravih ispitanika
prije i tijekom prirodne izloženosti peludu biljke
Ambrosia elatior L.***

DISERTACIJA



Zagreb, 2019

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Vedran Ostojić

***Promjene razine izotipova specifičnih
imunoglobulina u atopičara i zdravih ispitanika
prije i tijekom prirodne izloženosti peludu biljke
Ambrosia elatior L.***

DISERTACIJA

Zagreb, 2019

Disertacija je izrađena u sklopu Sveučilišnoga poslijediplomskog doktorskog studija iz biomedicinskih znanosti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Klinički dio istraživanja učinjen je na Klinici za unutarnje bolesti KB Sveti Duh, Zagreb.

Sva mjerenja i analize izvršeni su u Imunološkom zavodu Zagreb.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Asja Stipić Marković i prof. dr. sc. Drago Batinić

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Dragi Batiniću na iznimnoj pomoći u izradi ovog rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Branimiru Čvorišćecu na savjetima i iskustvu koje nam je za života prenosio.

Izuzetno zahvaljujem dr. sc. Anđi Treščec na nesebičnoj pomoći, stručnosti i znanju kod pripreme i izvođenja analitičke faze ove studije kao i interpretacije rezultata.

Nadalje, zahvaljujem vms. Sanji Berc i djelatnicima Imunološkog laboratorija Zavoda za medicinsku biokemiju Kliničke bolnice „Sveti Duh“ na pomoći kod organizacije istraživanja.

Zahvaljujem svim ispitanicima u studiji koji su svojim sudjelovanjem omogućili provedbu ovog istraživanja.

Na kraju, ponajviše zahvaljujem mojim roditeljima na stalnoj podršci i poticaju.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Patofiziološki mehanizmi neposredne preosjetljivosti	5
1.2. Oblici alergijskih bolesti	10
1.3. Liječenje alergijskih bolesti	13
1.4. Alergeni peludi biljke <i>Ambrosia elatior</i>	15
1.5. Imunoglobulini	23
1.6. Pregled dosadašnjih spoznaja	48
2. Hipoteza	53
3. Ciljevi rada	54
4. Ispitanici, materijali i metode	55
4.1. Opis istraživanja	55
4.2. Ispitanici	55
4.3. Plan rada	56
4.4. Kožni test ubodnom („prick“) metodom	57
4.6. Imunotest ELISA	57
4.7. Statističke metode	60
5. Rezultati	61
5.1. Promjene alergen-specifičnih IgE (slgE)	64
5.2. Promjene alergen-specifičnih IgA ₁ (slgA ₁)	65
5.3. Promjene alergen-specifičnih IgA ₂ (slgA ₂)	66
5.4. Promjene alergen- specifičnih IgG ₁ (slgG ₁)	67
5.5. Promjene alergen- specifičnih IgG ₂ (slgG ₂)	68
5.6. Promjene alergen- specifičnih IgG ₃ (slgG ₃)	69
5.7. Promjene alergen- specifičnih IgG ₄ (slgG ₄)	70
5.8. Promjene alergen- specifičnih IgM (slgM)	71
5.9. Promjene alergen- specifičnih IgD (slgD)	72
6. Rasprava	74
6.1. Izrazito visoki specifični IgM	78
6.2. Promjene specifičnih IgA1	81
6.3. Promjene specifičnih IgA2	82
6.4. Promjene specifičnih IgG1	83
6.5. Promjene specifičnih IgG2.	84
6.6. Promjene specifičnih IgG3	85

6.7. Promjene specifičnih IgG4 i "blokirajuća protutijela"	86
6.8. Promjene specifičnih IgD	89
6.9. Promjene specifičnih IgE	90
7. Zaključci	91
8. Sažetak	92
9. Summary	93
10. Popis literature	94
11. Biografija	112

Popis oznaka i kratica

AE	Ambrosia elatior
ADCC	stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (prema eng. <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
ALP	alkalna fosfataza
Amb a	alergen biljke Ambrosia elatior odn. Ambrosia artemisiifolia
APC	antigen-predočne stanice (prema eng. <i>antigen presenting cells</i>)
Art v	alergen biljke Artemisia vulgaris
ASGPR	asijaloglikoproteinski receptor
ASIT (SIT)	alergen-specifična imunoterapija
B	limfocit B
Bet v	alergen stabla Betula verrucosa
BSA	goveđi serumski albumin (prema eng. <i>bovine serum albmine</i>)
CD	stanični diferencijacijski antigeni (prema eng. <i>cluster of differentiation</i>)
CDC	stanična citotoksičnost ovisna o komplementu (prema eng. <i>complement dependent cytotoxicity</i>)
CTLA-4	protein 4 vezan uz citotoksični limfocit T (prema eng. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>)
DC	dendritička stanica (prema eng. <i>dendritic cell</i>)
ELISA	imunoenzimski test (prema eng. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
Fab	antigen vezujući fragment (prema eng. <i>fragment antigen-binding</i>)

Fc	konstantna regija imunoglobulina, (prema eng. <i>fragment crystallizable</i>)
Fcε	receptor konstantne regije imunoglobulina E
FcεRI	visokoafinitetni receptor konstantne regije imunoglobulina E
FcεRII	niskoafinitetni receptor konstantne regije imunoglobulina E
FOXP3	transkripcijski čimbenik FOXP3 (prema eng. <i>forkhead-winged helix protein 3</i>)
HLA	sistem leukocitnih antigena (prema eng. <i>human leukocyte antigen</i>)
HRP	enzim peroksidaza hrena (prema eng. <i>horseradish peroxidase</i>)
IFN-γ	interferon gama
Ig	imunoglobulin
IgA	imunoglobulin razreda A
IgD	imunoglobulin razreda D
IgE	imunoglobulin razreda E
IgG	imunoglobulin razreda G
IgM	imunoglobulin razreda M
IL	interleukin
ILC	urođene limfoidne stanice (prema eng. <i>innate lymphoid cells</i>)
INIT	intranazalna alergenspecifična imunoterapija
MHC	glavni sustav tkivne podudarnosti (prema eng. <i>major histocompatibility complex</i>)
NK	limfociti koji imaju urođenu sposobnost citotoksičkog ubijanja (prema eng. <i>natural killer</i>)

OIT	oralna alergen-specifična imunoterapija (prema eng. <i>oral allergen immunotherapy</i>)
OPD	ortofenilendiamin, supstrat za enzim peroksidazu
pDC	plazmocitoidna dendritička stanica (prema eng. <i>plasmacytoid dendritic cell</i>)
PD-1	protein programirane smrti stanice (prema eng. <i>programmed cell death protein</i>)
Phl p	alergen biljke <i>Phleum pratense</i>
pIgR	polimerni receptor molekule imunoglobulina
p-NPP	p-nitrofenilfosfat
SCIT	supkutana alergen-specifična imunoterapija (prema eng. <i>subcutaneous allergen immunotherapy</i>)
slg	alergen-specifični imunoglobulin
SLIT	sublingvalna alergen-specifična imunoterapija
STAT	obitelj prijenosnika signala i aktivatora prepisivanja (prema eng. <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
T	limfocit T
Tfh	T folikularni pomoćnički limfocit (prema eng. <i>T-follicular helper</i>)
TGF- β	transformirajući čimbenik rasta β (prema eng. <i>transforming growth factor</i>)
Th	T pomoćnički limfocit (prema eng. <i>T-helper cell</i>)
TLR	obitelj receptora nalik na Toll (prema eng. <i>Toll-like receptors</i>)
TNF- α	čimbenik nekroze tumora alfa (prema eng. <i>tumor necrosis factor</i>)

alpha)

Treg	regulacijski limfociti T
TRIM21	protein TRIM21 (prema eng. <i>tripartite motif-containing protein</i>)
TSLP	timusni stromalni limfopoetin (prema eng. <i>thymic stromal lymphopoietin</i>)
TYK2	tirozin kinaza 2 (prema eng. <i>tyrosine kinase 2</i>)

1. Uvod

Alergijske bolesti predstavljaju važan javnozdravstveni problem u našoj zemlji i svijetu. Incidencija alergijskih bolesti visoka je i poprima obilježja pandemije (1). U Hrvatskoj, u populaciji školske djece prevalencija simptoma astme iznosi 6,02%, alergijskog rinitisa 12,13%, a atopijskog dermatitisa (ekcema) 7,83% (2). U našoj zemlji oko 5% odraslih boluje od nekog oblika alergijskih bolesti, u Sjedinjenim američkim državama 7,8%, a u Velikoj Britaniji i Novom Zelandu više od 30% populacije (3). Specifična protutijela razreda IgE na alergene okoliša nalaze se u 40% populacije (3). Prema nekim izvorima više od 87 milijuna stanovnika Europske unije boluje od neke alergijske bolesti (3), a prema drugima čak više od 150 milijuna (1).

Za razliku od većine drugih kroničnih bolesti, atopijske bolesti pogađaju pretežito mladu populaciju, pa i djecu u najranijoj dobi. Iako najčešće ne uzrokuju po život opasna stanja, alergije su važan zdravstveni problem, vodeći uzrok zdravstvenih tegoba i velikog broja izostanaka iz škole i s posla. Neadekvatno i nepravovremeno liječenje alergijskih bolesti može uzrokovati trajne posljedice, što predstavlja ozbiljan teret ne samo pojedincu i njegovoj obitelji, već i društvu općenito (4). Prevalencija alergijskih bolesti je u stalnom porastu. Rast se bilježi u industrijaliziranim zemljama pa čak i u zemljama koje tradicionalno nemaju visoku prevalenciju alergijskih bolesti, poput Švicarske (5).

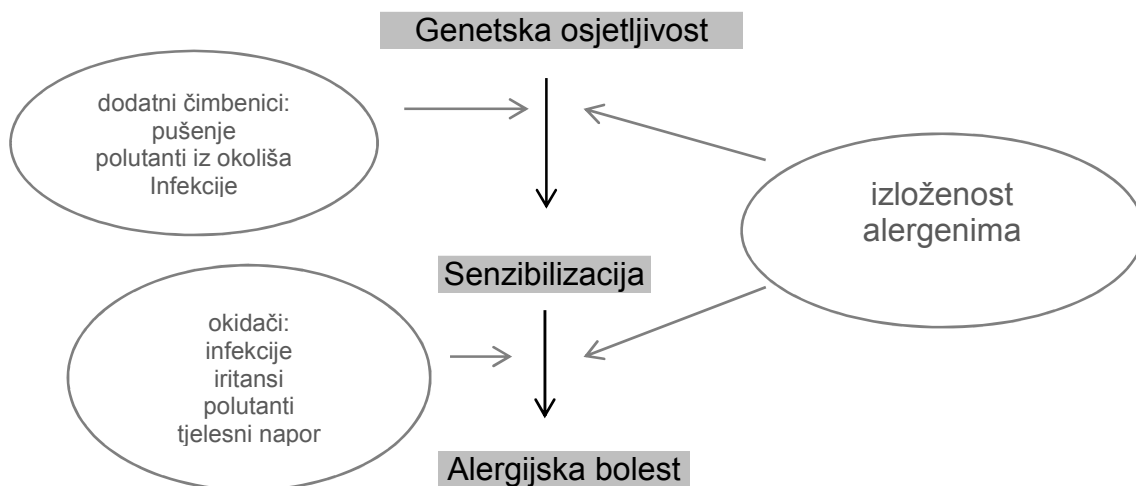
Atopija je naziv koji označava sklonost organizma pojačanoj sintezi imunoglobulina E (IgE) protiv jednog ili više ubikvitarnih antigena, a što je povezano s karakterističnim kliničkim manifestacijama koje se javljaju tijekom ponovnog kontakta s istim antigenima (6).

Alergija je bolest karakterizirana stvaranjem specifičnih protutijela razreda IgE i pojavom alergijskih simptoma kao što su crvenilo kože, curenje i svrbež nosa i očiju (7). Prvi zabilježeni slučaj alergijske reakcije s fatalnim ishodom vjerojatno je zabilježen slikovnim pismom u egipatskim piramidama. Kroz medicinsku literaturu se provlači podatak kako je prvi egipatski faraon Menes tijekom putovanja na području današnje Velike Britanije umro od anafilaksije nakon uboda pčele, iako povjesničari to negiraju (8). Povijesno, prvi načini liječenja alergijskih bolesti bazirani su na

konceptu homeopatije, poznatom stoljećima (9). Homeopatsko liječenje izvodi se primjenom supstance koja izaziva tegobe i bolest. Ova metoda priznata je i danas, u vidu imunizacije ili cijepljenja. Međutim, osim terapijskih uspjeha, primijećene su i fatalne reakcije. Koch je krajem 19. stoljeća opisao reakciju preosjetljivosti na tuberkulin, Flexner na serum, a von Behring na difterijski toksin. Charles Richet i Paul Portier su tijekom cijepljenja pasa protiv toksina iz jedne vrste meduze (*Physalia*), primijetili kako su psi izloženi subletalnoj dozi otrova reagirali gotovo fatalnom reakcijom nakon minimalne količine otrova. Za razliku od uspješne imunizacije ili zaštite (lat. phylaxis) došlo je do suprotne reakcije, koju su nazvali anaphylaxis.

Naziv alergija (αλλεργία) dolazi od dvije grčke riječi: „allos“ (άλλος), što znači „drugo ili strano“, te riječi „ergon“ (εργον), što znači „reakcija“. Koncept i izraz alergija potječu od bečkog pedijatra Clemensa von Pirqueta koji je 1906. godine uvidio kako su tjelesne reakcije njegovih pacijenata povezane s izlaganjem vanjskim alergenima, poput peludi ili određene hrane. U novije vrijeme pojam alergija obuhvaća „patološki preosjetljivu reakciju imunološkog sustava na inače neškodljiv antigen“ (10), odnosno prema definiciji prihvaćenoj od EAACI (Europska akademija za alergologiju i kliničku imunologiju) „reakcija preosjetljivosti uzrokovana imunološkim mehanizmima“ (11).

Danas prevladava mišljenje kako su za nastanak alergijskih bolesti, osim izloženosti alergenima, važni genetska sklonost i mnogi vanjski čimbenici, kao što su: promjena unutaršnjeg i vanjskog okoliša (prvenstveno pušenje), smanjena izloženost parazitskim i drugim infektivnim bolestima, virusne infekcije, utjecaj polutanata (12), socioekonomski uvjeti u razvijenim zemljama, imunizacija i drugo. Određene studije istraživale su i utjecaj trudnoće i porođajne težine. Neki autori utvrdili su nastanak specifičnih protutijela ne-alergijskih izotipova na pelud breze u djece koja su ranije prešla na prehranu povrćem. Povrće sadržava križno-reaktivne proteine s alergenima peludi, što može dovesti do tolerancije na te alergene (13).



Slika 1. Čimbenici genotipa i okoliša u nastanku alergijske bolesti.

Nasljeđe ima veliku ulogu u nastanku alergijskih bolesti. Primijećeno je kako osobe čija su oba roditelja atopičari, u 80% slučajeva razvijaju neku od alergijskih bolesti. Navedeno čini nasljeđe najznačajnijim čimbenikom rizika (14). Identični blizanci, međutim, zajedno obolijevaju od alergijskih bolesti samo u 50% slučajeva. Budući da su alergije češće u nekim obiteljima, genetskim analizama se pokušalo izolirati gene odgovorne za sklonost atopiji. Do danas je identificirano oko 100 takvih gena (15). Primjerice, za nastanak astme važni su geni ADAM33, DPP10, PHF11, HLAG, OPN, NSPR1 (GPRA), UPAR, IRAKM i drugi. U nastanku alergijskih bolesti identificirani su i geni na kromosomima 4p14 (pored TLR1, TLR6, TLR10), 6p21.33 (pored HLA-C i MICA), 5p13.1 (pored PTGER4), 2q33.1 u PLCL1, 3q28 u LPP, 20q13.2 u NFATC2, 4q27 u ADAD1 i 14q21.1 (pored FOXA1 i TTC6). Gen na lokusu 6p21.32 u regiji koja kodira molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti II (MHC II, prema eng. *major histocompatibility complex II*) posebno je značajno povezan s alergijom na mačju dlaku i epitel (16).

Međutim, svaki od navedenih rizičnih čimbenika uzrokom je bolesti kod vrlo malog broja oboljelih (17). Godine 1989. Strachan je primijetio kako su alergijske bolesti znatno rjeđe u obiteljima s više članova, u kojima je izloženost mikroorganizmima znatno veća i time favoriziran Th1 imunološki odgovor i okoliš (18).

Dodatni utjecaj na tijek alergijske bolesti imaju i fizikalne karakteristike peludi, kao što su veličina peludnog zrnca, kemijska sposobnost otapanja na sluznici, prodiranja u sluznicu itd. Peludno zrno biljke Ambrosia promjera je 18-22 μm i spada u veća peludna zrnca. Zbog svoje veličine većinom se zaustavlja na sluznici gornjih dišnih puteva i tamo uzrokuje jače tegobe. Alergeni s manjom veličinom čestica, poput alergene kućne prašinske grinje (*Dermatophagoides pteronyssinus*, Der p), čije su čestice manje od 5 μm , jače prodiru u donje dišne puteve nošeni strujom zraka i zbog toga češće uzrokuju simptome astme (19, 20).

Preosjetljivost na korovnu vrstu *Ambrosia elatior* (AE) koja agresivno osvaja neobrađene površine, pogotovo one u gradovima predstavlja sve veći javnozdravstveni problem. Izloženost peludi AE danas je široko rasprostranjena pojava, za čiju ilustraciju mogu poslužiti brojne akcije koje imaju za cilj uništavanje ove korovne vrste (5).

Posljednjih 10-ak godina, došlo je do premještanja fokusa istraživanja pojave prekapćanja imunološkog odgovora (Th1 vs. Th2) na dendritičke stanice pa konačno i na stanice koje prve dolaze u dodir s alergenima – epitelne stanice. Dok su se ranije inicijalnim događajem koji pokreće Th2-odgovor smatrali događaji u dendritičkim stanicama i njihovim podvrstama, sada se zna da početno zbivanje ima ishodište u epitelnim stanicama (21).

1.1. Patofiziološki mehanizmi neposredne preosjetljivosti

Reakcije preosjetljivosti se prema Philipu Gellu i Robinu Coombsu klasificiraju u četiri tipa:

- tip I: anafilaktičke reakcije (ovisne o IgE)
- tip II: reakcije posredovane protutijelima
- tip III: reakcije uzrokovane imunokompleksima
- tip IV: kasna ili stanična preosjetljivost

Alergijske reakcije pripadaju reakciji tipa I koje se danas uglavnom nazivaju neposrednom preosjetljivošću.

Krajem prošlog stoljeća primijećeno je kako se nakon antigenske stimulacije pomagački CD4⁺ limfociti T, a time i imunološki odgovor sisavaca najčešće polariziraju u dva glavna smjera - tip 1 (Th1) i tip 2 (Th2) (22). Ova dva tipa su vrlo različita u svojim mehanizmima indukcije citokina, privlačenja stanica urođene imunosti, efektorskih limfocita T i proizvodnje izotipova imunoglobulina s ciljem uklanjanja antigena, odnosno patogena.

Tip 1 imunološkog odgovora (Th1) karakteriziran je proizvodnjom proupalnih citokina IL-2, IFN- γ i TNF (23). Inducira se kao odgovor na bakterije, viruse, gljivice i protozoe. Th1- citokinski profil je prvenstveno usmjeren obrani protiv intracelularnih patogena kao što su:

- bakterije, npr. *Mycobacterium avium* (24), *Salmonella typhimurium* (25) i *L. monocytogenes* (26),
- virusi, npr. Herpes simplex virusa (27), virusa influence A (28) i vakcinije (29),
- gljivice, npr. *Cryptococcus neoformans* (30)

Th1 odgovor pomaže i u odbacivanju tumorskih stanica (31). Ukoliko je takav odgovor usmjeren na stanice domaćina, javljaju se autoimuni poremećaji, npr. inzulin-neovisni dijabetes melitus (32), reumatoidni artritis (33), autoimune bolesti, upalne bolesti crijeva (34) i reakcije presatka protiv primatelja (eng. *graft versus host disease*) nakon alogenične transplantacije koštane srži (35). Aktivirani Th1-limfociti

izražavaju transkripcijske čimbenike T-bet i Hlx (obitelj homebox proteina), kao i signalnu molekulu STAT4.

Tip 2 imunološkog odgovora (Th2) filogenetski je mlađi. Prevladava mišljenje kako je taj oblik imunološkog odgovora evoluirao nakon Th1 odgovora uslijed potrebe za borbom s recentnijim patogenima. Nastaje najčešće kao odgovor na infekcije izvanstaničnim bakterijama i parazitima, posebice nematodama i helmintima te u alergijskim bolestima. Th2-limfociti luče citokine IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13, a karakterizira ih izražaj transkripcijskih čimbenika GATA-3 i c-Maf (obitelj AP-1), kao i signalna molekula STAT6 (36). Th2-limfociti su odgovorni za proizvodnju IgE tako što potiču izotipsko prekapčanje imunoglobulina (IgM → IgE) u podraženim limfocitima B, nakon čega se B-stanice diferenciraju u plazma-stanice i sintetiziraju antigen-specifični IgE (36, 37, 38). Stvoreni IgE se na periferiji veže za visokoafinitetni Fcε-receptor na bazofilima i mastocitima (39). Vežanje antigena za IgE na mastocitima i bazofilima dovodi do aktivacije tih stanica i brze degranulacije i ispuštanja u okoliš brojnih medijatora odgovornih za daljnja patofiziološka zbivanja (*v. kasnije*). Th2-limfociti su važni i za sluzničku imunost gdje dodatno potiču hipersekreciju sluzi i u bronhima dovode do bronhalne hiperreaktivnosti. Pretjerano aktivni Th2-odgovor može dovesti do patoloških promjena u domaćinu u vidu kroničnih upalnih bolesti dišnog sustava, kao što su astma i alergijski rinitis s lokalnom infiltracijom slgE i specifičnih CD4+ T stanica (40).

Tijekom sezone polinacije dišni sustav čovjeka izložen je velikoj koncentraciji peludnih zrnaca. Udahnuti alergeni se iz dišnog sustava uklanjaju uglavnom pomoću filtriranja u velikim dišnim putevima (oko 95%), a preostalim dijelom pomoću cilijarnog mehanizma i lokalne produkcije antimikrobnih peptida (41). Aeroalergeni koji se ovim načinom ne uspijevaju otkloniti otapaju se na sluznici, omogućavajući oslobađanje svojih proteinskih sastojaka. Tek mali udio alergena (~3%) koji dospijeva na intaktnu sluznicu prodire kroz nju (42). Alergeni su prema svom kemijskom sastavu uglavnom proteaze. Svojom proteolitičkom aktivnošću i prodiranjem kroz sluznicu oponašaju parazitne infekcije. Proteolizom dovode do ozljede epitela i međustaničnih prostora kidajući međustanične adhezijske spojeve što im omogućuje prodiranje kroz epitel (43). Prodiranju alergena pogoduju i oštećenja epitela drugim uzrocima, kao npr. infektivnim agensima, onečišćenjima duhanskim dimom, produktima izgaranja fosilnih goriva i drugo (44, 45). Čini se kako se proces prodiranja antigena kroz

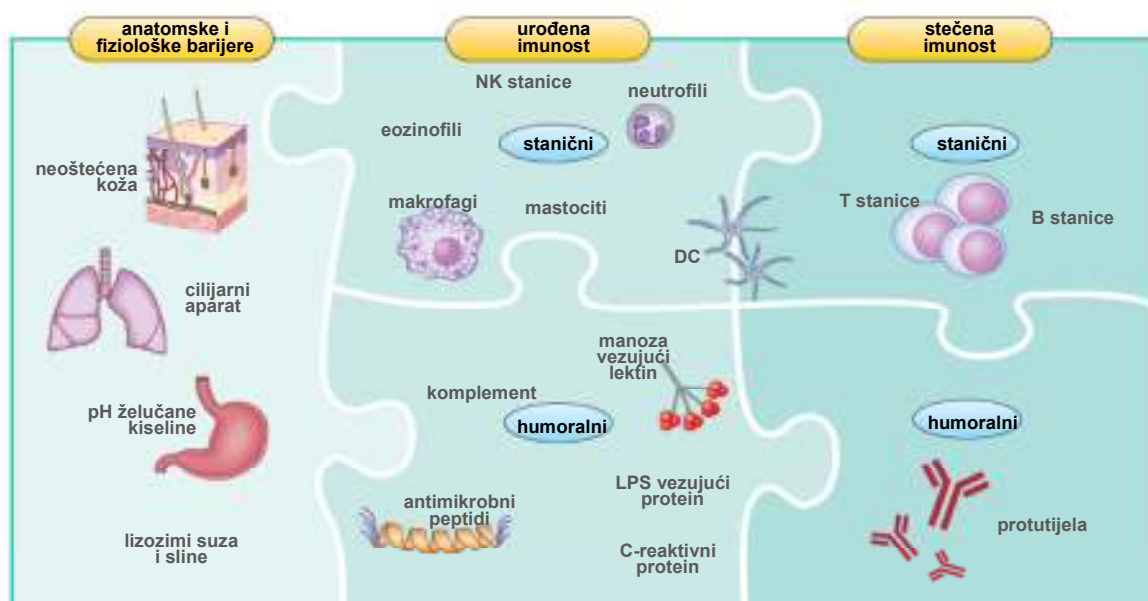
sluznicu u bolesnika s alergijom odvija i aktivno, putem lipidnih molekula i invaginacija stanične membrane, tzv. kaveola (46). Nakon izlaganja alergenima iz okoliša u tih osoba ubrzo dolazi do ekstravazacije leukocita, prijenosa alergena kroz kaveole putem 16 različitih proteina (uglavnom kaveolina 2 i flotilina 2) kroz bazalnu membranu do mastocita. Sličan proces odvija se i u bronhoalveolarnom epitelu (47). U zdravih ljudi ovaj proces izostaje (48). Određeni alergeni, poput otrova insekata, unose se pod kožu ubodom žalca i tako zaobilaze epitelnu membranu.

Vežanje alergena za IgE molekule na mastocitima i bazofilima dovodi do aktivacije tih stanica, degranulacije i ispuštanja u stanični okoliš brojnih medijatora odgovornih za daljnja patofiziološka zbivanja (23). Alergenom aktivirani bazofili i mastociti otpuštaju rane i kasne medijatore reakcije. Rani medijatori su biogeni amini (histamin), lipidni medijatori (leukotrijeni i prostaglandin) i enzimi (proteaze), dok se nakon aktivacije sintetiziraju brojni citokini i kemokini (kao npr. prostaglandin D₂, leukotrijen C₄ i TNF-alfa). Otpuštanje ranih medijatora dovodi do kontrakcije glatke muskulature, povećanja propusnosti krvnih žila, kemotaksije i regrutiranja upalnih stanica te oštećenja tkiva. Kasni medijatori, uglavnom citokini (IL-3, IL-4, IL-5 i IL-9) dovode do tkivne eozinofilije i proliferacije mastocita i upalne reakcije. Sve zajedno dovodi po manifestacija alergijske upale.

Brojne studije dokazale su mnoge kliničke i imunobiokemijske raznolikosti reagiranja imunološkog sustava bolesnika s alergijom i zdravih ispitanika, uglavnom to pripisujući promjeni dominantnog smjera reagiranja na podražaj alergenom iz nealergijskog Th1 smjera u alergijski Th2-smjer (49). Pri tome su razlozi bili traženi u pomagačkim limfocitima i njihovim genetskim i funkcionalnim osobitostima. Posljednjih 10-ak godina došlo je do premještanja fokusa istraživanja alergija s Th1/Th2-stanica na dendritičke stanice i na prve stanice koje dolaze u dodir s alergenima, a to su epitelne stanice. Dok su se ranije inicijalnim događajem koji pokreće Th2-odgovor smatrali događaji u dendritičkim stanicama i njihovim podvrstama, sada je poznato kako je ishodište tog polarizacijskog zbivanja u epitelnim stanicama (21). Inicijacija imunološkog odgovora tipa 2 počinje lučenjem IL-25, IL-33 i timusnog stromalnog limfopoetina (TSLP, prema eng. *thymic stromal lymphopoietin*) iz epitelnih stanica i alveolarnih makrofaga pod utjecajem produkata koji nastaju kao odgovor epitelnih stanica na oštećenje, prvenstveno alarmina. Čini se kako u ovom procesu ulogu ima i disfunkcija epitelnih stanica uzrokovana

mutacijom strukturnih proteina, kao što je to pokazano na primjeru mutacije filagrina u bolesnika s atopijskim dermatitisom (50). Posljedično tome, u bolesnika s alergijom nalazi se smanjena sekrecija Th1-citokina (IL-2, TNF i INF- γ), a povećana proliferacija Th2-limfocita i proizvodnja Th2-citokina (IL-4, IL-5 i IL-13) (51).

Obrana organizma od stranih proteina složeni je sustav u kojem zajedno učestvuju anatomske i fiziološke barijere, urođeni i stečeni imunitet.



Slika 2. Anatomske i fiziološke barijere, urođeni i stečeni imunitet u obrani od stranih proteina (preuzeto i modificirano iz Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125: 24-32)

Nastanak i povećanje incidencije alergijskih bolesti nastoji se objasniti raznim teorijama temeljenim na epidemiološkim studijama. Najčešće su:

- higijenska hipoteza, temeljena na spoznajama kako su alergijske bolesti češće u razvijenim zemljama s višim higijenskim standardima, smanjenim brojem članova obitelji i smanjenim brojem rođaka (18, 3);
- proširena higijenska teorija, prema kojoj utjecaj imaju promjena načina života u zatvorenim prostorima, upotreba antibiotika, antipiretika i cijepljenje (52);

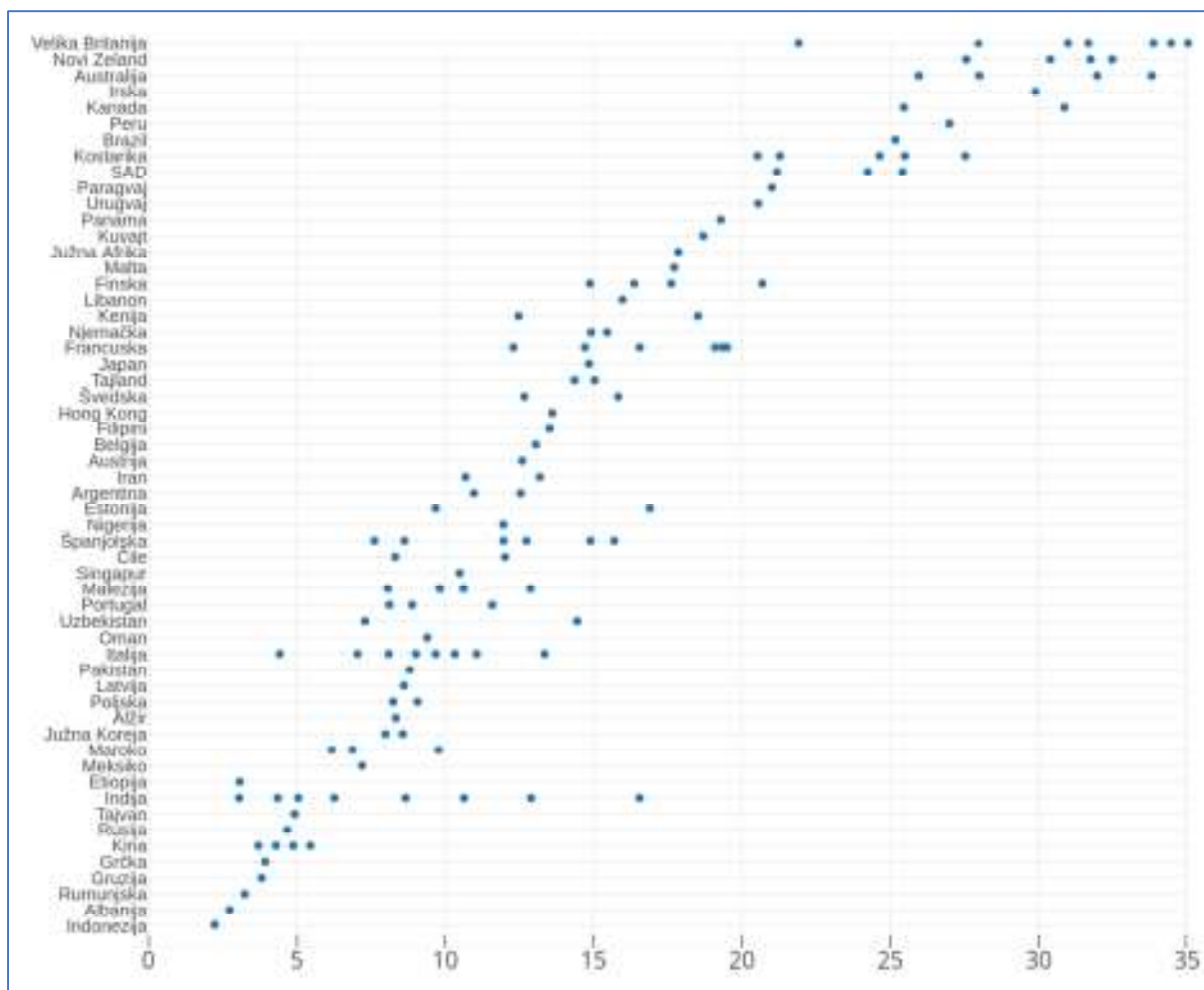
- smanjena izloženost infektivnim uzročnicima (53);
- skraćeni period laktacije (54);
- promjene mikroflore crijeva (55);
- promjene prehrambenih običaja, sa smanjenom količinom antioksidansa, uz dodatak vitamina, konzervansa i umjetnih boja, margarina, biljnih ulja (56);
- povećan unos soli (54);
- smanjena sinteza D vitamina u koži, uslijed produženog boravka u zatvorenom prostoru, pokrivanja kože odjećom, korištenjem krema za sunčanje (57);
- supstitucija D vitamina u ranoj dobi u sklopu profilakse rahitisa (58);
- promjena prehrane trudnica, sa smanjenim unosom vitamina D, antioksidanta (59);
- izloženost polutantima i duhanskom dimu (60);
- izloženost alergenima unutarnjeg okoliša, kao što su grinje, žohari itd. (61);
- psihosocijalni stres (62).

1.2. Oblici alergijskih bolesti

Oblici alergijskih bolesti su alergijski rinitis (rinokonjuktivitis), astma, urtikarija i angioedem.

Alergijski rinokonjuktivitis je bolest karakterizirana alergijskom upalom sluznice nosa i očiju. Bolest se obično lako prepoznaje, a obilježena je pojavom obilne vodenaste sekrecije iz nosne sluznice, crvenilom očnih konjuktiva i suzenjem. Simptomi se u našim krajevima tipično javljaju tijekom proljeća i krajem srpnja i početkom kolovoza. Traju do početka hladnijih dana, nekada sve do početka listopada. Za pojavu simptoma alergijskog rinokonjuktivitisa dovoljna je mala koncentracija peludnih zrnaca biljke *Ambrosia* u zraku, svega 5-10/m³ (63). Tegobe su izraženije kod boravka na otvorenom, za vjetrovitih i suhih dana. U izraženim oblicima tegobe su takvog intenziteta da utječu na smanjenje budnosti i kognitivnih funkcija, što može značajno utjecati na subjektivni osjećaj kvalitete života, radnu sposobnost, sigurnost u prometu i drugo (64).

Astma je teži oblik alergijske bolesti. Karakterizirana je kroničnom alergijskom upalom sluznice bronha, reverzibilnom bronhoopstrukcijom, povećanom bronhalnom hiperreaktivnošću (*eng. airway/bronchial hyperresponsiveness, AHR/BHR*) i povećanim lučenjem sluzi iz vrčastih stanica. Bolest danas zahvaća više od 300 milijuna ljudi u svijetu. Procjenjuje se kako zbog astme godišnje umire 250,000 bolesnika (65). Očekuje se kako će do kraja 2025. godine od astme bolovati više od 400.000.000 ljudi (66). Na sreću, korištenjem inhalacijskih kortikosteroida mortalitet od ove bolesti je u protekla dva desetljeća u značajnom padu (67).



Slika 3. Prevalencija astme u svijetu (%) (prema podacima: Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Lancet 1998; 351(9111):1225–1232)

Iako čestice peludi biljke *Ambrosia elatior* zbog veličine uglavnom ne prodiru u donje dišne puteve i ne izazivaju astmatske tegobe, tijekom kratkih oluja i kiša dolazi do slijeganja alergena u niže slojeve, kao i formiranja čestica manjih od 5 μm . Takve čestice ipak prodiru dublje donje dišne puteve, dalje od terminalnih bronhiola sve do u alveolarne vodove, gdje dovode do pojave simptoma astme. Jača kiša dovodi do prizemljavanja i sljepljivanja peludi i smanjenja simptoma (68).

Astmatsko, bronhokonstriktorsko reagiranje bronha ima zaštitnu ulogu u obrani od brojnih parazita, npr. *Nocardiae brasiliensis*. Reakcijom koja se slikovito opisuje kao „weep and sweep“ (u slobodnom prijevodu „plači i pometi“) parazit *Nocardia brasiliensis* inducira Th2-odgovor koji rezultira kontrakcijom bronha i prekomjernim

lučenjem sluzi, što izbacuje parazit iz bronhalnog sustava (69). Dokazano je kako infekcije dišnog sustava uzrokovane rinovirusom ili respiratornim sincicijskim virusom također promiču Th2-odgovor i dovode do simptoma alergijske astme (70).

Urtikarija je kožna bolest karakterizirana eritematoznim ili blijedim kožnim promjenama iznad razine kože, koje na pritisak nestaju. Obično su bezbolne, ali su praćene jakim osjećajem svrbeža. Pojedinačna kožna promjena razvija se tijekom nekoliko sati, a traje do 24 sata. Ukoliko se grebanjem zbog svrbeža koža ne ozlijedi, urtikarija ne ostavlja posljedice. Samo manji dio urtikarija (oko 5-10%) su uzrokovane alergijskom etiologijom. Većinom urtikarija ima druge uzroke (infektivne, fizikalne, kemijske i dr.).

Angioedem je bolest obično udružena s urtikarijom, karakterizirana nastankom akutnog, nepravilnog, ograničenog potkožnog edema. Edem se obično javlja u predjelu periorbite, usnica, jezika, dlanova, tabana i crijevne stjenke, gdje je koncentracija makrofaga najveća.

U kliničkoj praksi je uobičajeno anamnestičku sumnju na alergijsku etiologiju bolesti potvrditi kožnim testovima, tj. *in vivo* dokazom atopijskog reagiranja na alergene iz okoliša te potom dokazivanjem specifičnih imunoglobulina E.

1.3. Liječenje alergijskih bolesti

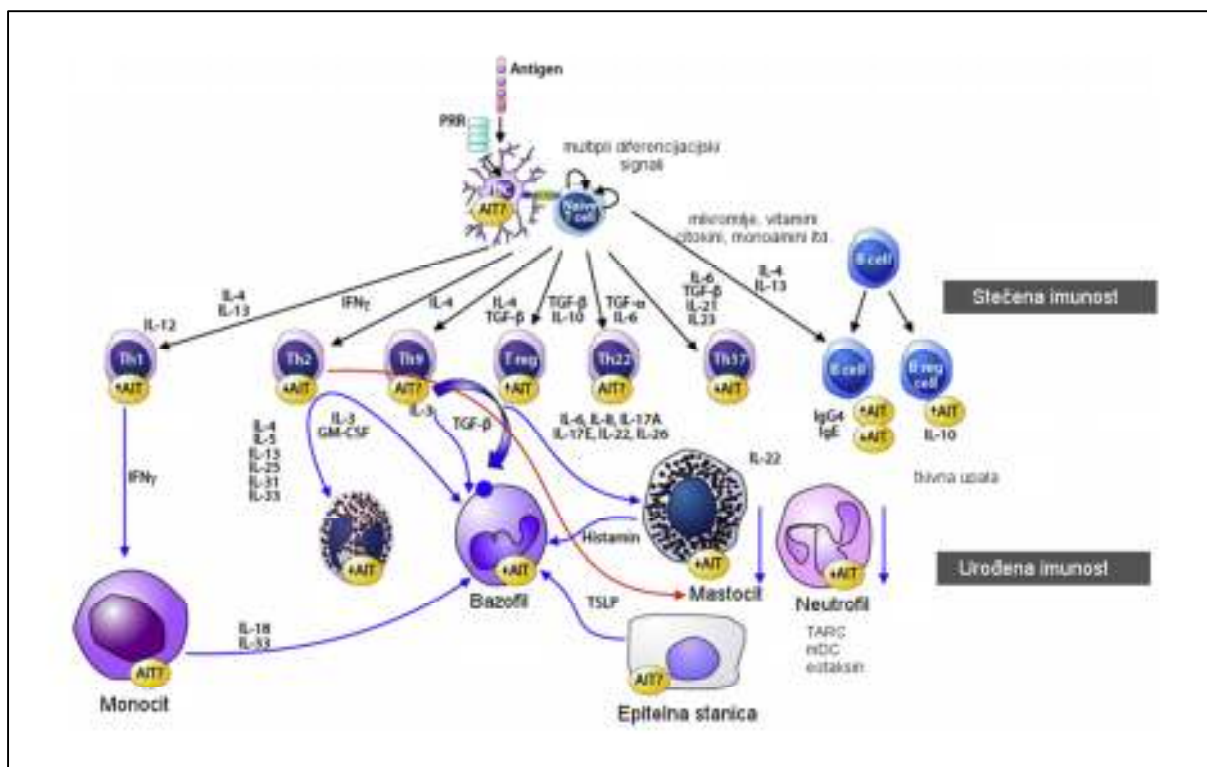
Liječenje alergijskih bolesti temelji se na izbjegavanju i smanjenju izloženosti alergenu, medikamentoznoj terapiji i specifičnoj imunoterapiji. Smanjenje izloženosti alergenu se postiže izbjegavanjem boravka na otvorenom, naročito tijekom suhih i vjetrovitih dana i u prijednevima. Naročito je poželjno izbjeći boravak na otvorenom prije i nakon oluje.

Medikamentozno liječenje rinokonjuktivitisa temelji se na intranazalnoj primjeni kortikosteroida i antihistaminika (uglavnom blokatora histaminskih receptora H1). U izraženijim oblicima bolesti dodatno se primjenjuju lokalna primjena antihistaminika i dekonjestiva (71).

Medikamentozno liječenje astme temelji se na intrabronhalnoj (inhalacijskoj) primjeni kortikosteroida, dugodjelujućih i kratkodjelujućih β 2-agonista i oralnih antileukotrijena. Drugu liniju terapije predstavljaju kromoglikati u prahu, inhalacijski ipratropij, oralna primjena glukokortikoida i sporooslobađajući teofilin (72).

Klinička ispitivanja pokazala su učinkovitost omalizumaba, rekombinantnog monoklonskog protutijela na humanu IgE molekulu, u liječenju težih oblika astme posredovane s IgE pri čemu je učinak ovisan o dozi (7, 74).

Kliničko iskustvo poboljšanja alergijske bolesti nakon primjene specifične imunoterapije ekstraktom peludi biljke *Ambrosia elatior* staro je više od jednog stoljeća. Specifična imunoterapija (SIT) jest metoda u kojoj se primjenjuju male, ali rastuće količine alergenskog ekstrakta supkutanim (SCIT), intranazalnim (INIT), oralnim (OIT) ili sublingvalnim (SLIT) putem. Iako prvi opis primjene SIT seže u 1911. godinu, do danas još ne znamo točan mehanizam djelovanja tog oblika imunoterapije (76).



Slika 4. Složenost odgovora stečenog i urođenog imunskog sustava nakon izloženosti alergenu i alergenspecifičnoj imunoterapiji (AIT) (preuzeto i modificirano iz Jutel i sur. International Consensus on Allergen Immunotherapy II: Mechanisms, standardization, and pharmacoeconomics. The Journal of allergy and clinical immunology. J Allergy Clin Immunol. 2016;137(2):358-68)

Do danas su opisani brojni mehanizmi kojima SIT utječe na imunološki sustav. Osim indukcije periferne tolerancije poticanjem Treg-stanica i lučenja IL-10 (77), opisane su i sljedeće pojave: supresija upalnih stanica i poticanje neaktiviranih upalnih dendritičnih stanica, supresija Th1, Th2 i Th17 efektorskih stanica, supresija stvaranja sIgE, poticanje stvaranja sIgG4 i sIgA protutijela u B stanicama, supresija proliferacije mastocita, bazofila i eozinofila, sprječavanje migracije efektorskih T stanica u tkiva, povećano lučenje IL-10 i TGF- β , ekspresija CTLA-4 i proteina PD-1 na CD4 limfocitima. Prevladava mišljenje kako se predominantni Th2-limfocitni fenotip, karakterističan za alergijske bolesti, preusmjerava u Th1-fenotip. Uspješnost SIT u liječenju bolesti dokazana je kliničkim studijama (78, 79, 80), a učinak je proporcionalan količini primijenjenog antigena (81). Iskustva s primjenom inkapsuliranog peptida Amb a1 su ohrabrujuća (82). Pобоljšanje simptoma astme pokazano je tijekom primjene SCIT, ali je zbog izostanka dokaza o produženom djelovanju SCIT nakon druge godine primjene hiposenzibilizacije, primjena SCIT u

astmi još uvijek dvojbena (83). Sporadični smrtni slučajevi povezani s primjenom imunoterapije tijekom povijesti dovele su do zabrane ove metode liječenja u nekim zemljama. Unatoč tome, uz pažljivo pridržavanje hiposenzibilizacijskih protokola i standardizaciju alergenskih pripravaka, ozbiljne nuspojave su vrlo rijetke (82) i ovaj oblik liječenja se sa sigurnošću koristi u mnogim zemljama pa tako i u nas.

1.4. Alergeni peludi biljke *Ambrosia elatior*

Naziv antigen je vjerojatno izvorno skovan kako bi označio tvar koja potiče stvaranje protutijela (eng. *antibody-generator*, njem. *Immunkörperbildner*). Alergenima se nazivaju antigeni koji, iako relativno bezazleni, u atopičara potiču reakciju neposredne preosjetljivosti, koja može potencijalno imati i fatalan ishod. Obično su to proteini, koji samostalno ili u obliku haptena, vezane za proteinski nosač potiču stvaranje IgE (36). Neke su značajke karakteristične za gotovo sve alergene, a to su kemijska postojanost, mala molekulska masa, visok sadržaj proteaza, glikozilacija i topljivost u tjelesnim tekućinama.

Ambrosia elatior (lat. *Ambrosia elatior* ili *Ambrosia artemisiifolia*, eng. *short ragweed* ili *common ragweed*) je biljka (lat. *Planta*) iz odjeljka kritosjemenjača (lat. *Magnoliophyta*), razreda dvosupnica (lat. *Magnoliopsidae*), reda zvjezdanolika (lat. *Asterales*) porodice glavočika (lat. *Asteraceae*) (84, 85). Kod nas je poznata pod imenima pelinolisni limundžik, fazanuša, fazanka, partizanka i Krausova trava. Biljke iz ove porodice najbrojnija su skupina cvjetnica na planetu. Okupljaju gotovo 20.000 vrsta.

Ime Ambrozija dolazi od istoimene grčke riječi (grč. ἀμβροσία, besmrtnan) jer je prema grčkoj mitologiji bila hrana bogova koja ih je činila besmrtnim. U Europu je obična Ambrozija uvezena u 19. stoljeću. *Ambrosia* je danas jedna od najraširenijih korovnih vrsta u svijetu. Primjerci biljki iz porodice glavočika izložene su u Botaničkom vrtu u Zagrebu.



Slika 5. Sekcija Botaničkog vrta u Zagrebu posvećena porodici glavočika (lat. Asteraceae, autor Vedran Ostojić)

Danas je poznato oko 50 vrsta biljke *Ambrosia*. *Ambrosia maritima* potječe iz Europe. Ostale vrste donesene su u Europu naknadno: *Ambrosia elatior* ili *artemiisifolia* (eng. *short or common ragweed*), *Ambrosia trifida* (eng. *giant ragweed*), *Ambrosia tenuifolia* (nalazi se samo u Francuskoj i Španjolskoj) i *Ambrosia coronopifolia* (eng. *perennial ragweed*) (86).

Ambrosia elatior je u Europu prenesena 1863. godine iz stepsko-prerijskih područja sjeverne Amerike u Njemačku, brodovima koji su prevozili sjemenke lucerne, biljke koja se koristi uglavnom za prehranu stoke. Budući da sa sjemenkama nisu preneseni i njezini prirodni neprijatelji, biljka *Ambrosia elatior* se izrazito brzo širila po Europi. Njezino prvo pojavljivanje u Hrvatskoj zabilježeno je 1941. godine, otuda i naziv „partizanka“. Prilagodljiva je i otporna biljka kojoj pogoduje suha klima i otvoreni okoliš. U Europi se može naći dvadesetak podvrsta biljke *Ambrosia*, a naročito je raširena u tri endemska područja: području bivšeg panonskog mora, u dolini rijeke Rone u južnoj Francuskoj i Lombardiji te u sjevernoj Italiji (87) gdje zauzima oko 90% zemljane površine (88). Sve je veći problem njezino širenje i u hladnije dijelove Europe, poput Švicarske, pa čak i Švedske (89). Osim u Sjevernoj Americi ta je biljka raširena i u Japanu gdje je poznata pod nazivom *butakusa* (u prijevodu svinjska trava), Kini i subtropskim dijelovima Australije. Uz alergen kućne prašinske grinje (lat. *Dermatophygoies pteronyssinus*) *Ambrosia elatior* predstavlja najčešće zastupljeni aero alergen u Hrvatskoj. U SAD-u je u 50% bolesnika s polenozom prisutna senzibilizacija na pelud biljke *Ambrosia elatior*. Tegobe koje pelud biljke *Ambrosia elatior* uzrokuje u osjetljivih bolesnika su toliko jake da su brojne zemlje, među kojima je i Hrvatska zakonski regulirale materijalnu odgovornost vlasnika

zemljišta na čijem se zemljištu taj korov razmnožava, kao i pokrenule javno-zdravstvene akcije uklanjanja korova. Stanovnici regija s predominacijom biljke *Ambrosia* s vremenom razvijaju toleranciju na korov, dok doseljenici u te regije imaju tri puta veću prevalenciju alergijskih bolesti (90).

Ambrosia elatior je jednogodišnja biljka, uspravne i razgranate stabljike, visine 20 - 150 cm. Stabljika je posuta grubim dlačicama. Listovi su jajasta oblika, također posuti dlačicama i jako nazubljeni. Vrsta je podložna varijabilnosti koja se prvenstveno ogleda u stupnju pokrivenosti stabljike i listova dlačicama i broju režnjeva na listu. Cvjetovi su skupljeni u obliku grozdova, isključivo na vrhovima stabla ili grane i žućkaste su boje. Biljka je dvospolna: muški i ženski cvjetovi nalaze se na istoj biljci.

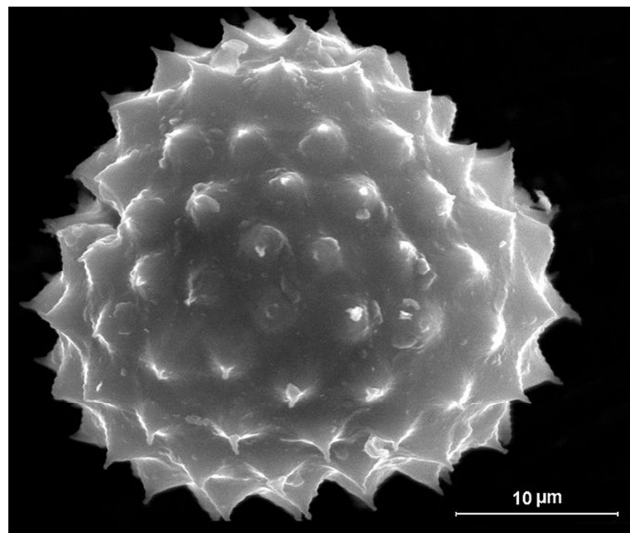


Slika 6. Stabljika i lišće biljke *Ambrosia elatior*, autor Vedran Ostojić

Niče u travnju, a cvjetati počinje sredinom srpnja. Cvate do kraja rujna. Biljka proizvodi pelud u velikim količinama (zrela biljka stvara i do osam milijuna peludnih zrnaca), a oprašuje se vjetrom, što je još jedna od karakteristika alergogenih biljaka. Peludno zrno veličine je 18-22 μm . Pelud se počinje proizvoditi od jutarnjih sati do oko podneva kada je koncentracija peludnih zrnaca najveća. U gradskim središtima vršne koncentracije peludi donesene vjetrom (ali u nižim vrijednostima) pojavljuju se tijekom poslijepodneva i večeri. Temperatura i vlažnost zraka nemaju značajniji utjecaj na produkciju peludi. Iako čestice peludi biljke *Ambrosia* zbog svoje veličine

uglavnom ne prodiru u donje dišne puteve, tijekom kratkih oluja i kratkih kiša dolazi do slijeganja alergena u niže slojeve, kao i formiranja čestica manjih od 5 μm koje ipak prodiru u donje dišne puteve i dovode do pojave simptoma astme. Veliki utjecaj ima i kiša koja za kišnih dana zalijepi pelud na tlu i time sprječava njegovo raznošenje (68). Za vrijeme suhih i vjetrovitih dana pelud biljke *Ambrosia* se može raznositi i na području širokom stotinjak kilometara (91). Širenju sjemenki i peludi doprinosi i kretanje vozila, prijenos infestirane zemlje, proizvodnja sjemenki za ptice i drugo. Biljka najviše voli napuštena staništa, poput željezničkih pruga, cesta, puteva, nedovoljno obrađenih zemljišta i polja. Često raste i kao korov u nasadima suncokreta, šećerne repe, kukuruza, soje i krumpira.

Biljka proizvodi prosječno 3.000-6.000 sjemenki, veće jedinke i do 60.000, koje su prilagodljive i vrlo otporne te odlično opremljene za preživljavanje. Šire se vjetrom, vodom i tlom. U zemlji sjemenke mogu preživjeti više od 40 godina, čak i u najnepovoljnijim uvjetima, poput smrzavanja (92). Nakon košnje stabljika biljke *Ambrosia* se brzo oporavlja i ponovno dolazi u fazu cvjetanja za 20-ak dana, stoga je u akcijama eradikacije Ambrozije neophodno provoditi odstranjivanje cijele biljke čupanjem.



Slika 7. Peludno zrno biljke *Ambrosia elatior*, povećanje 3700x.
Preuzeto sa https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ambrosia_artem_1-4.jpg

Kretanje koncentracije peludi u zraku mjeri se od 1967 godine. U našoj zemlji mjerenja provodi Zavod za javno zdravstvo „dr. Andrija Štampar“. Na temelju tih podataka planirano je uzimanje uzoraka ispitanika u ovoj studiji.

Procjenjuje se kako zrnce peludi sadrži i oslobađa 40-ak različitih proteina, od čega je kao uzročnik alergijskih bolesti identificirano njih 11. Ukupna količina apsorbiranog alergena na sluznici čovjeka u jednoj sezoni ne prelazi 1 µg. Zanimljivo je kako je ova, iako mala količina alergena, ipak odgovorna za pojavu simptoma bolesti.

Od peludi biljke Ambrosia se izrađuje pripravak za hiposenzibilizaciju (93).

Danas je poznato 11 alergena biljke Ambrosia elatior koji se prema važećoj nomenklaturi obilježavaju kao Amb a 1 – Amb a 12. Oznake sadrže prva tri slova roda, početno slovo vrste i kronološki broj purifikacije. Oznaka Amb a 2 se više ne koristi. Najvažnijima za nastanak senzibilizacije se smatraju alergeni Amb a 1 i Amb a 11 (94).

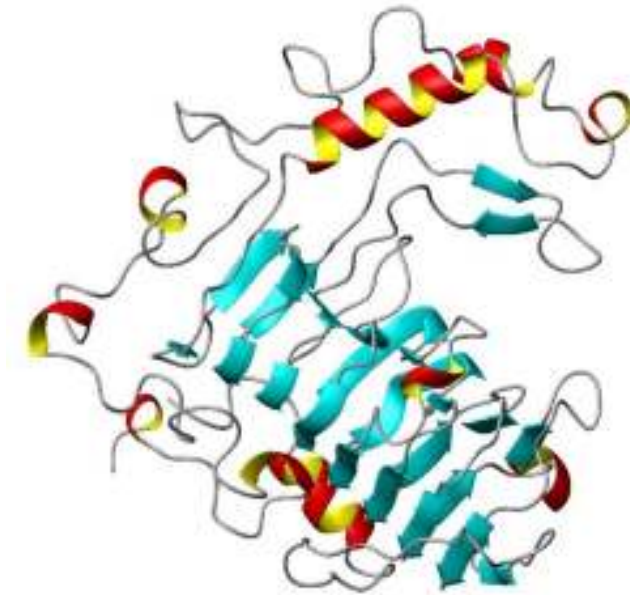
Tablica 1. Alergeni biljke *Ambrosia elatior*. Izvor: <http://www.allergen.org>

Alergen	Naziv	Molekularna težina (kDa)
Amb a 1	Pektat lijaza	38
Amb a 2	Promijenjen u Amb a 1.05. broj se više ne koristi	41
Amb a 3	Plastocijanin	11
Amb a 4	Protein sličan defenzinu (eng. <i>defensin-like protein</i>)	30
Amb a 5	-	5
Amb a 6	Nespecifični protein transfera lipida tip 1 (eng. <i>non-specific lipid transfer protein type 1</i>)	10
Amb a 7	Plastocijanin	12
Amb a 8	Profilin	14
Amb a 9	Polkalcin	10
Amb a 10	Protein sličan polkalcinu	8
Amb a 11	Cistein proteaza	37
Amb a 12	Enolaza	48

Različite podvrste biljke *Ambrosia* proizvode proteine čije se sekvence ponešto razlikuju, stoga je u nomenklaturu dodano označavanje izoalergena i izoforme (varijante).

Izoalergeni su definirani kao alergeni iste vrste, slične molekulske težine i biološke funkcije, čije se sekvence podudaraju u više od 2/3. Termini izoforma i varijanta označavaju one proteine koji se međusobno razlikuju u svega nekoliko sekvenci aminokiselina. Trenutno se razlikuje 5 izoalergena Amb a 1: Amb a 1.01, Amb a 1.02,

Amb a 1.03, Amb a 1.04 i Amb a 1.05 kao više izoformi (varijanta) svakog od njih, kao npr. Amb a 1.0201, Amb a 1.0202 i tako dalje (95).



Slika 8. Prikaz trodimenzionalne strukture alergena biljke *Ambrosia elatior* (preuzeto s http://fermi.utmb.edu/SDAP/ModelMolMol/797_Y90.jpg)

Zbog sličnosti u slijedu aminokiselina, pelud biljke *Ambrosia* pokazuje pojavu križne reaktivnosti (eng. *cross-reactivity*) s drugim korovima iz iste porodice, kao što su Artemizija, suncokret i kamilica (96). U slučaju Artemizije, učestalost pojave križne reaktivnosti se penje i do 80% (97), najčešće zbog profilina, ali i glavnih alergena peludi biljke Artemizija (Art v 1 i Art v 2). Nazalnom provokacijom ekstraktom Artemizije postiže se nazalna opstrukcija u vrlo visokom postotku bolesnika osjetljivih na Ambroziju (98).

Osim križne reaktivnosti peludi biljke *Ambrosia* sa srodnim vrstama korova, postoji i križna reaktivnost s travama (glavnim alergenom trave *Phleum*, Phl p4), biljkama iz porodica *Cucurbitaceama* (dinja, lubenica, krastavci) i *Musaceama* (banane).

Tablica 2. Primjeri međusobne križne reaktivnosti alergena. Preuzeto iz: Janeway's Immunobiology, 2017, Garland Science, USA (ref. 99)

Izvor alergena	Križno reaktivni izvori alergena	Alergen
pelud Ambrozije	dinja, kamilica, med, banana, sjemenke suncokreta	pektat lijaza
pelud Artemizije	celer, mrkva, začini, dinja, lubenica, jabuka, kamilica, lješnjak, kestena	lipidni transferni proteini, profili, 34 i 60 kDa alergeni, Art v 1 analozi
pelud zimzelenih stabala	dinja, jabuka, breskva, kivi	pektat lijaza
pelud breze	jabuka, mrkva, trešnja, kruška, breskva, šljiva, komorač, orah, krumpir, špinat, pšenica, heljda, kikiriki, med, celer, kivi, peršin	profilin, Bet v 1 i Bet v 6
pelud trava	dinja, rajčica, lubenica, naranča, trešnja, krumpir	profilin
grinje	školjke, puževi	tropomiozin
žohar	školjke, puževi	tropomiozin
perje	žutanjak	serumski albumin (Gal d 5)
bjelanjak u prahu	hrana s dodanim jajima	lizozim (Gal d 4)
meso	epitel životinja	serumski albumin
lateks	Aspergillus	mangan superoksid dismutaza
lateks	avokado, krumpir, banana, rajčica, kesten, kivi, biljke, mrkva	patatin (npr. Sol t 1), profilin, kitinaze, Hev b 6, Per a 1

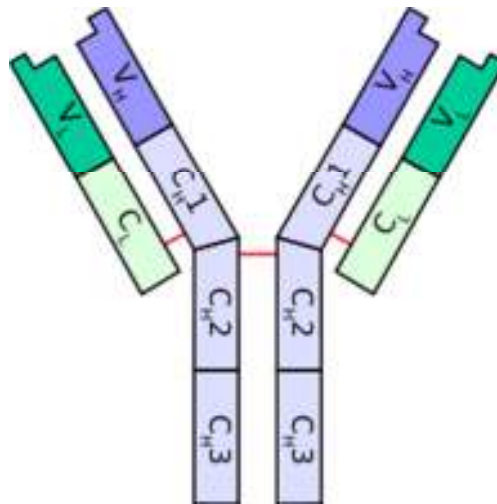
1.5. Imunoglobulini

Imunoglobulini, odnosno protutijela, su glikoproteini karakterizirani izrazito velikom raznolikošću u području veznog mjesta za antigen. Uz receptore limfocita T i sustav HLA, čine jedan od najpolimorfnijih sustava u organizmu. Zajedno s njima čine tzv. imunoglobulinsku supergensku obitelj (IgSF, od eng. *immunoglobulin supergene family*). Raniji naziv gamaglobulini nastao je iz činjenice kako se u elektroforezi proteina imunoglobulini nalaze uglavnom u gama frakciji.

Imunoglobuline luče isključivo limfociti B vertebrata i filogenetski mlađih vrsta. Nalaze se na membrani limfocita B kao integralni antigenski receptori ili vezani za Fc-receptore na drugim leukocitima (npr. mastocitima) te u slobodnoj formi: u serumu, tkivima, na svim sluznicama i u izlučevinama. Naivni limfociti B luče vrlo malene količine protutijela IgM i IgD. Nakon njihove aktivacije i maturacije do stadija plazma-stanica započinju lučiti velike količine imunoglobulina u solubilnoj formi. U sljedećim odjeljcima koji opisuju imunoglobuline korišteni su udžbenički materijali (36, 99) pa se stoga oni neće opetovano navoditi kao izvor.

1.5.1. Struktura imunoglobulina

Molekula imunoglobulina se sastoji od dva lanca, teškog (H, od eng. *heavy*) i lakog (L, od eng. *light*). Oba lanca sastoje se od konstantnih regija (C, od eng. *constant*) i varijabilnih regija (V) (slika 9). Lanci su međusobno povezani disulfidnim vezama. Pod djelovanjem papaina molekula imunoglobulina se cijepa u tzv. Fab-fragment (eng. *fragment antigen-binding*) i Fc-fragment (eng. *fragment crystallizable*). Regija zgloba ili „šarke“ omogućuje mobilnost varijabilnog dijela molekule i formiranje oblika slova "Y" do "T", što je potvrđeno elektronskom mikroskopijom. Ovu mogućnost nemaju molekule razreda IgM (pentameri).



Slika 9. Shematski prikaz molekule imunoglobulina: V označava varijabilno dio, C konstantni dio, H teški lanac, a L laki lanac (preuzeto od https://en.wikipedia.org/wiki/Immunoglobulin_light_chain);

Specifičnost protutijela omogućava povezivanje sa stranim molekulama (antigenima), a u stvarnosti samo jednim dijelom antigena - antigenim epitopom ili paratopom. Učinak protutijela u organizmu, tj. njegova efektorska funkcija određena je vrstom konstantne regije teškog lanca. Laki lanac se sastoji se od varijabilnog (V) segmenta (95-101 aminokiselina), veznog (eng. *joining*, J) segmenta od oko 13 aminokiselina i konstantne (C) regije. Laki lanac sadržava konstantnu regiju koja može biti jedna od dva tipa, kapa (κ) ili lambda (λ), a svaki je kodiran na zasebnom kromosomu. Lanac λ kodiran je genima na kromosomu 22, a lanac κ genima na kromosomu 2.

Teški lanac je sačinjen od varijabilnog (V) segmenta (95-101 aminokiselina), razlikovnog (eng. *diversity*, D) segmenta, veznog (eng. *joining*, J) segmenta od oko 13 aminokiselina i konstantne regije (C) koja može imati 3 ili 4 domene.

1.5.2. Specifičnost protutijela

Osnovna funkcija humoralnog obrambenog sustava je osigurati prilagodljivu obranu protiv ogromnog spektra mikroorganizama i njihovih produkata. Budući da je broj različitih antigena praktički neograničen, genom ne može sadržavati toliko veliki broj gena koji bi kodirali sve moguće epitope, kako sadašnje, tako i za antigene koji bi se mogli pojaviti u budućnosti. Imunosni sustavi raznih vertebrata ovaj problem su evolucijski riješili na više načina.

Tablica 3. Broj funkcionalnih gena potrebnih za kodiranje imunoglobulina u ljudi. Preuzeto iz: Janeway's immunobiology, 2017, Garland Science (ref. 99)

Segment	Laki lanci		Teški lanci
	κ	λ	H
Varijabilni (V)	34-38	29-33	38-46
Razlikovni (D)	0	0	23
Vezni (J)	5	4-5	6
Konstantni (C)	1	4-5	9

Raznolikost i time specifičnost varijabilnih regija u ljudi se postiže pomoću više mehanizama: kombinacijom segmenata (eng. *combinatorial diversity*), nepreciznim spajanjem segmenata (eng. *junctional diversity*), umetanjem segmenata (eng. *insertional diversity*), te naknadno, somatskom hipermutacijom V-regije tijekom klonске ekspanzije aktiviranih limfocita B u sekundarnim limfnim tkivima.

Najznačajniji je postupak kreiranje epitopskog repertoara preslagivanjem i izrezivanjem genoma limfocita B koje obavlja enzim V(D)J-rekombinaza (nazvana prema nazivima segmenata varijabilnog dijela Ig molekule). V(D)J-rekombinaza nastaje od rekombinacijskih aktivacijskih gena RAG-1 i RAG-2 gena (prema eng. *recombination-activating genes*), DNA-ovisnom protein kinazom (DNA-PK), Artemis proteinom, DNA ligazom IV i DNA popravilačkim proteinom XRCC4 (od eng. *X-ray repair cross-complementing protein 4*). Defekt u RAG-1 ili RAG-2 genu dovodi do nemogućnosti rekombinacije gena i teške imunodeficijencije.

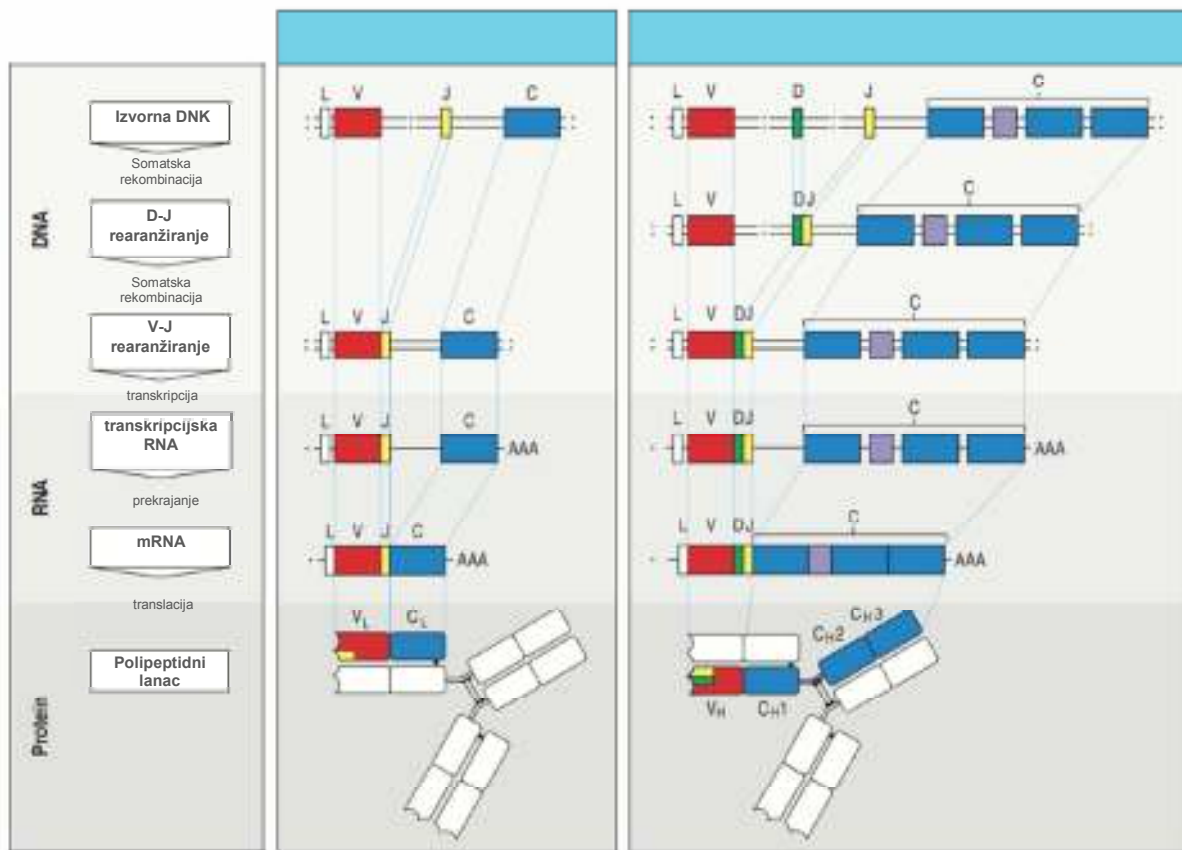
U procesu diferencijacije limfocita B i kreiranja epitopskog repertoara rekombiniraju se po jedan od više alela V i J lakog lanca, te V, D i J teškog lanca. Svakom od otprilike 50 V gena, 20 D gena i 6 J gena prethodi signalna rekombinantna sekvenca. Postupak rekombinacije nije posve precizan i često dolazi do grešaka u prepisivanju od nekoliko aminokiselina. Ovim postupkom "nemarnog" prepisivanja postiže se dodatna različitost segmenata. Insercijska različitost postiže se aktivnošću terminalne

deoksinukleotidne transferaze (TdT), enzima koji je prisutan tijekom preuredbe teškog lanca. Ovaj enzim dodaje nasumične nukleotide na V-D i D-J spojištima.

Finalizacija teškog lanca dovršava se dodavanjem konstantne regije. Prema vrsti konstantnih regija razlikujemo 5 osnovnih tipova imunoglobulina (tzv. izotipova): A, D, E, G i M. Tipovi G i A se dodatno dijele u 4 podrazreda (G1-G4), odnosno (A1 i A2). One se međusobno razlikuju prema veličini, odnosno broju konstantnih CH-domena i udjelu ugljikohidrata.

Finalizacija lakog lanca dovršava se dodavanjem konstantne regije, koja može biti jedna od dva tipa - kapa (κ) ili lambda (λ). Najprije se dodaje kapa (κ) lanac. Ukoliko je preuredba kapa gena nefunkcionalna, odnosno neproduktivna na oba lokusa, tada se preuredbe sele na lambda genski lokus.

Nakon primanja odgovarajućih signala od pomagačkih limfocita T, limfocit B ulazi u proces izotipskog prekapčanja za što je potrebna aktivna suradnja aktiviranih pomagačkih limfocita T, posebice molekule CD40-L koja stupa u interakciju s CD40 na limfocitu B. Tijekom tog procesa se nepovratno izrezuje dio genoma između lokusa IgM i lokusa za jedan od izotipa teškog lanca. Teoretski bi bilo moguće izazvati prekapčanje s IgG na IgE i iz IgE u IgA jer je genom za te konstantne regije još uvijek očuvan.



Slika 10. Preuredba imunoglobulinskih gena. Preuzeto iz: Janeway's Immunobiology, 2017., Garland Science, USA (ref. 99)

1.5.3. Somatska hipermutacija

Procesom somatske hipermutacije u limfocitima B se dodatno mijenja afinitet protutijela za određeni antigen (100). Proces se odvija posredovanjem enzima AID (prema eng. *activation induced cytidine deaminase*) u zametnim središtima sekundarnih limfnih tkiva. Mutacije se događaju u vrlo visokom postotku, otprilike 1 na svakih 10^3 parova baza. Za razliku od gena varijabilne regije, mutacije vrlo rijetko pogađaju gene za konstantne regije, otprilike 1 na svakih 10^{10} parova baza. Budući da su varijabilne regije kodirane s po ~ 360 parova baza, vjerojatnost nastanka mutacije dijeljenjem B stanice iznosi i više od 50%. Općenito je prihvaćeno da u jednoj generaciji dijeljenja stanice (svakih 6-7 sati), nastaje jedna somatska hipermutacija. Proces hipermutacija rezultira preživljavanjem limfocita B koje nakon mutacija stvaraju receptor (membransko protutijelo) jakog afiniteta i koje se veže za antigen izložen na folikularnim dendritičnim stanicama. Te se stanice većim dijelom

diferenciraju u plazma-stanice koje proizvode molekule protutijela, a manji dio ostaje kao memorijski limfociti B.



Slika 11. Trodimenzionalni prikaz molekule imunoglobulina.
Preuzeto iz <http://visualscience.ru>, 2011

1.5.4. Funkcija imunoglobulina

Funkcija imunoglobulina je dojaka - prepoznavanje antigena i efektorska uloga.

Varijabilne domene jednog teškog i jednog lakog lanca (V_H i V_L) zajedno čine paratop, odnosno mjesto vezivanja protutijela na antigen. Oba lanca paratopa sadržavaju hipervarijabilne regije, oko aminokiselina na pozicijama 30, 50 i 95. Označavaju se i sa $Hv1-3$ i $Lv1-3$, odnosno zajedno kao CDR1-3. Rendgenskom kristalografijom pokazano je da su upravo te regije uključene u vezanje antigena. Paratopi mogu vezati više vrsta molekula: glikoproteine, nukleinske kiseline, ugljikohidrate i lipide. Veza između epitopa i paratopa je nekovanlentna, a ovisi o vodikovim vezama, elektrostatskim nabojima, van der Waalsovima silama i hidrofobnim svojstvima. Epitop i paratop su komplementarni po svim ovim navedenim osobinama.

Jačina interakcije i vezanja epitopa za molekulu antigena, odnosno njen dio (paratop) naziva se afinitet. Nazivom aviditet označava se ukupna jačina vezanja cijele molekule imunoglobulina za antigen. Tako npr. molekula IgM može imati niski afinitet, ali zbog formiranja pentamera imati visoki aviditet.

Vežanjem imunoglobulina na antigen omogućava se početak njegove efektorske funkcije.

Svi razredi imunoglobulina (osim IgD) vezivanjem za strane molekule i oblaganjem stanica patogena omogućavaju i njihovo otklanjanje iz organizma, jednim od slijedećih načina:

- neutralizacijom toksina i drugih produkata mikroorganizama;
- vezanjem i blokadom prodora mikroorganizama (npr. na sluznicama);
- vezanjem konstantne regije za Fc-receptore fagocita čime je omogućena olakšana fagocitoza mikroba (opsonizacija);
- aktiviranjem C1-komponente komplementa, čime započinju kaskadu aktivacije komplementa i lizu patogena posredovanjem komplementa (CDC);
- vezanjem za NK-stanice, čime omogućavaju citotoksičnu aktivnost ovisnu o protutijelima (ADCC);
- aktiviranjem mastocita omogućavaju uništavanje patogena otpuštanjem medijatora i citokina (degranulaciju);
- formiranjem imunokompleksa koji se aktivno odstranjuju iz organizma.

Razredi imunoglobulina međusobno se razlikuju po svojim efektorskim funkcijama. U tablici 4 sažeto su prikazana najvažnije osobine imunoglobulina.

Tablica 4. Funkcije imunoglobulina. Preuzeto iz: Janeway's Immunobiology, 2017, Garland Science, USA (ref. 99)

Osobina	Razredi i podrazredi imunoglobulina								
	G1	G2	G3	G4	M	A1	A2	D	E
Teški lanac	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	μ	α_1	α_2	δ	ϵ
Molekulska težina (kDa)	146	146	170	146	970	160	160	184	188
Serumska koncentracija (mg/ml)	9	3	1	0.5	1.5	3	0.5	0.03	0.00-005
Poluvijek (dani)	21	20	7	21	5-10	6	6	3	3
Broj aminokiselina zglobne regije	15	12	62	12					
Broj disulfidnih veza	2	4	11	2					
Osjetljivost na proteolizu	++	+/-	+++	+					
Aktivacija komplementa "klasičnim" putem	++	+	+++	-	+++	-	-	-	-
Aktivacija komplementa "alternativnim" putem	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Transplacentarni prijenos	+++	+	++	+/-	-	-	-	-	-
Vežanje na makrofage i druge fagocite	+	-	+	+/-	-	+	+	-	+
Visoki afinitet vežanja na mastocite i bazofile	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
Neutralizacija	++	++	++	++	+	++	++	-	-
Oponizacija	+++	+	++	+	-	+	+	-	-
Aktivacija komplementa	++	+	+++	-	+++	+	+	-	-
Prolaz kroz epitel	-	-	-	-	+	+++	+++	-	-
Difuzija u tkiva	+++	+++	+++	+++	+/-	++	++	-	+

1.5.5. IgE

IgE molekule su prvi puta opisali Teruko i Kimishige Ishizaka 1966. godine (101) i to upravo tijekom istraživanja alergije na pelud biljke Ambrosia. Novi razred imunoglobulina nazvan je IgE ('e' od eritem) prema zapaženoj činjenici kako su svi ispitanici imali eritem. Strukturno se razlikuju od ostalih izotipova imunoglobulina time što su asimetrični i zakrivljeni. Teški lanac molekule IgE sastoji se od jedne varijabilne i 4 konstantne CH-domene. Zglobna regija nedostaje pa je prilagodljivost varijabilnih domena smanjena, ali je time povećana otpornost na proteolitičke enzime. Molekulska težina IgE iznosi 190 kDa. Ovaj imunoglobulin ne aktivira komplement, ne sudjeluje u opsonizaciji te nema svojstvo neutralizacije antigena.

Zbog visokog afiniteta Fc-receptora za IgE ($Fc\epsilon RI$), gotovo sveukupni IgE u organizmu (oko 90%) vezan je za membranu mastocita i bazofila, dok se u serumu nalazi svega 0,05% od njegove ukupne količine u tijelu (36). Nalazi se samo u sisavaca, a glavna mu je uloga obrana od parazita i protozoa. To je dokazano na životinjskim modelima, ali ne u potpunosti u ljudi. Od naročite je važnosti u imunopatogenezi alergijskih bolesti.

IgE se luče već u intrauterino doba. U malim koncentracijama se mogu naći već u pupčanoj krvi (do 3 kU/L) (102). Dok neki autori nalaze slgE u najranijoj dojenačkoj dobi (103) zbog senzibilizacije alergenima ili križno reaktivnim proteinima iz hrane, neki su autori slgE pokazali tek u dobi od 3. godine i kasnije (104).

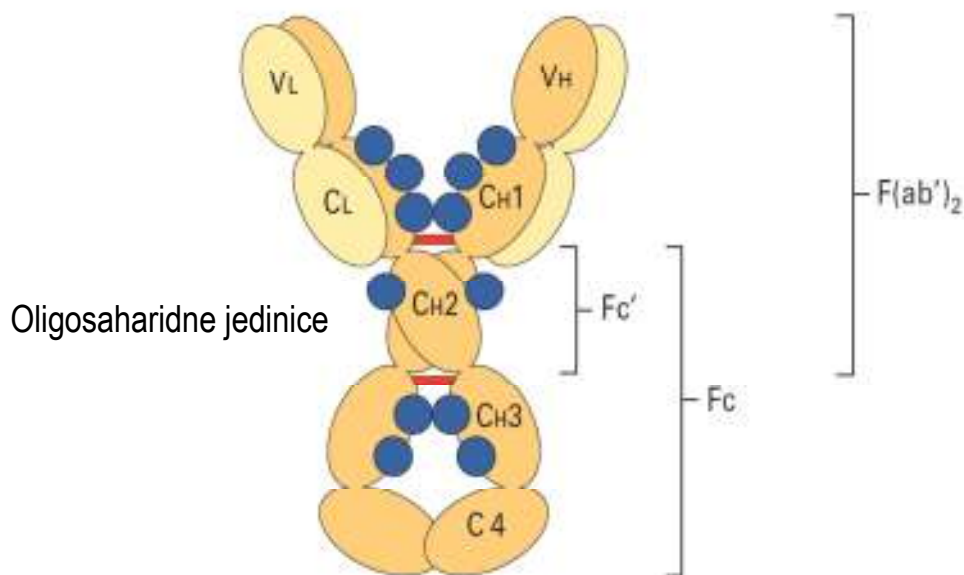
Poluvijek serumskog, nevezanog IgE je svega 2-3 dana, dok je poluvijek IgE vezanog za $Fc\epsilon R$ mastocita i bazofila znatno dulji i mjeri se u tjednima (105). Razine IgE u serumu su vrlo stabilne tijekom godina, što se tumači prisutnošću dugovjekih, memorijskih IgE+ limfocita B, koji svojom stalnom produkcijom održavaju razine slgE (106).

Postoje dvije vrste receptora konstantne regije imunoglobulina ($Fc\epsilon$) :

- $Fc\epsilon RI$ (tip I $Fc\epsilon$ receptora), receptor visokog afiniteta, nalazi se na mastocitima i bazofilima, kao i na dendritičkim stanicama u ljudi i miševa. Veže se za $C\epsilon 2$ i $C\epsilon 3$ regiju. Čini se kako i neutrofilni mogu izražavati $Fc\epsilon RI$, ali je taj izražaj minimalan i neovisan o koncentraciji IgE (107);

- FcεRII (tip II Fcε receptora), receptor niskog afiniteta, također poznat i kao CD23, a nalazi se na membrani limfocita B, makrofaga, eozinofila, trombocita i nekim limfocitima B. Veže se za Cε3 regiju IgE.

Vežanje antigena i IgE vezanoga za membranski FcεRI mastocita uzrokuje križno povezivanje (eng. *cross-linking*) IgE i agregaciju FcεRI, što dovodi do aktivacijskog signala odgovornog za degranulaciju mastocita, odnosno bazofila i oslobađanje medijatora upale i pojave simptoma alergijskih bolesti. Vežanje antigena za IgE na bazofilima dovodi do otpuštanja citokina tipa 2, kao što su IL-4, IL-5 i IL-13.

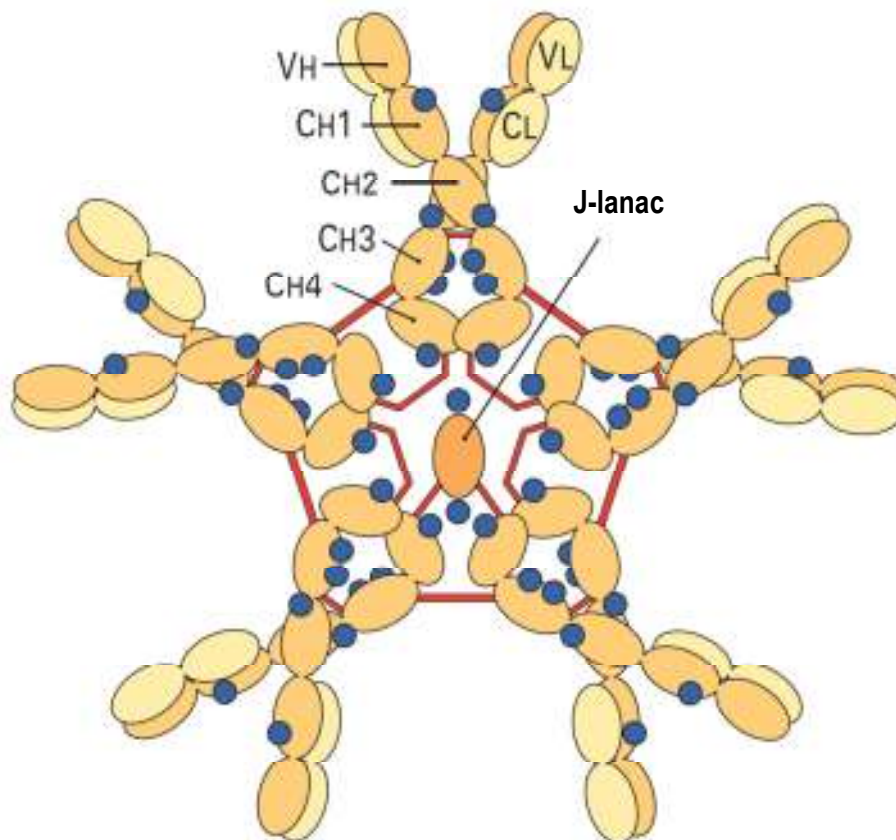


Slika 12: IgE molekula s većim brojem oligosaharidnih jedinica. Preuzeto iz: Janeway's Immunobiology, 2017, Garland Science, USA (ref. 99).

Za nastanak protutijela IgE visokoga afiniteta nužno je prethodno izotipsko prekapčanje s IgM, preko IgG na IgE. Čini se kako nastaju neposredno nakon prekapčanja u IgG4 (108) i to pod utjecajem istih Th2-citokina. Neki autori pripisuju IgE i važnu ulogu u imunološkom prepoznavanju i lizi tumorskih stanica (109).

1.5.6. IgM

IgM se prvi pojavljuje tijekom ontogeneze limfocita B i to prvo kao membranski receptor limfocita B (monomerni IgM), a kasnije i kao sekrecijski produkt plazma-stanica. Sekrecijski IgM je manjim dijelom u obliku monomera, a pretežito u obliku polimera: tetramera (u morskih pasa), pentamera (u čovjeka i miša) ili heksamera (u žaba). Za povezivanje su odgovorni cisteini koji tvore disulfidne veze u CH-domenama, kao i lanac J (prema eng. *joining*) kojeg stvaraju plazma-stanice. U odsutnosti lanca J ne nastaje pentamerna struktura.



Slika 13. Molekula IgM. Preuzeto iz: Janeway's Immunobiology, 2017, Garland Science, USA (ref. 99)

Zbog pentamerne strukture uglavnom ne penetriraju u tkiva i uglavnom se zadržavaju u intravaskularnom prostoru, u serumu i limfi.

Za razliku od IgG, molekula IgM ima relativno niski afinitet vezanja za antigen. Međutim, zbog svojeg pentamernog oblika i ukupno čak 10 aktivnih mjesta za vezanje antigena, IgM pokazuju visoki aviditet za antigen. U praksi se, međutim, IgM vežu s najviše 6 mjesta. Unatoč niskom afinitetu, zbog visokog aviditeta može se detektirati čak i u slučaju manje imunogeničnih antigena. Poluvijek im je kratak, oko 5 dana.

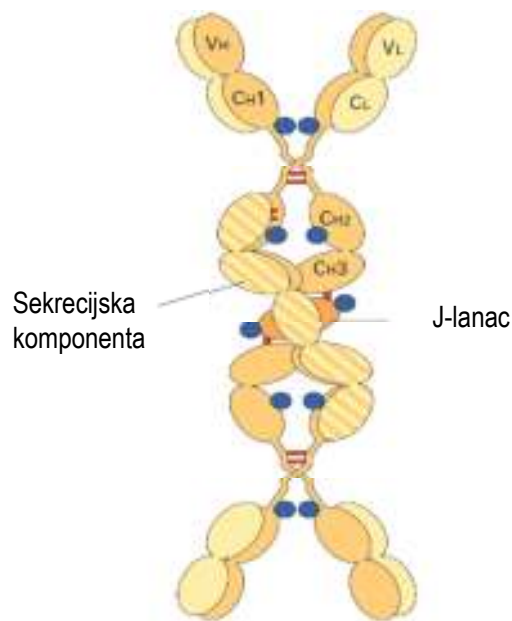
IgM jako dobro aktivira komplement klasičnim putem, ali nije efikasan opsonin. Izuzetno su važni u intravaskularnom prostoru, za uklanjanje virusa i bakterija koji imaju polisaharidnu ovojnica. Vezanjem na polimerni receptor molekule imunoglobulina (pIgR) koji služi i za transcitozu IgA, IgM se secernira u lumen crijeva. Posebna podvrsta limfocita B luči IgM u velikoj količini na pleuri i peritoneumu te u slezeni, bez potrebe pomoći pomagačkih limfocita T, uglavnom direktnom aktivacijom polisaharidnim antigenima neovisnim o timusu. IgM ne prelaze placentarnu barijeru. U krvi novorođenčeta pojavljuju se od 11. tjedna. IgM se često veže za neke antigene (uključujući i vlastite molekule) čak i u odsutnosti očevide primarne imunizacije, pa se stoga naziva i »prirodnim protutijelom«.

1.5.7. IgA

IgA je ključna skupina imunoglobulina koja predstavlja prvu liniju obrane epitelnih površina od infektivnih organizama i inhaliranih antigena. Izrazito su aktivni u neutralizaciji antigena. Izotipsko prekapčanje na ovaj razred imunoglobulina u limfocitima B uglavnom nastaje pod utjecajem TGF- β . Dnevna količina izlučenog IgA se procjenjuje na 3-5 grama, što čini oko 15% ukupne dnevne proizvodnje svih imunoglobulina. Razlikuju se dva izotipa IgA: IgA1 i IgA2. Prvi prevladava u serumu (~80%), a IgA2 u sekretima (110). U IgA2 molekulama teški i laki lanci nisu povezani s disulfidnim, već s nekovalentnim vezama. U sekrecijskim limfoidnim tkivima (npr. gastrointestinalnim povezanim limfoidnim tkivom ili GALT-om) udio proizvodnje IgA2 je veći nego kod nesekrecijskih limfoidnih organa (npr. u slezeni i perifernim limfnim čvorovima).

Ljudi, čimpanze, gorile i giboni za kodiranje teškog lanca konstantne regije (C α) imaju dva gena. IgA stoga ima dva podrazreda: IgA1 i IgA2 (111). Za razliku od njih, većina ostalih vrsta imaju samo jedan gen za teški lanac α -lanac i samo jedan oblik IgA. Zanimljivo je kako zec ima čak 13 gena koji kodiraju teške α -lance, od kojih je čak 11 aktivnih. Aminokiselinski slijed obaju ljudskih gena za konstantnu regiju teškog lanca α je vrlo sličan i čini se da je nastao duplikacijom.

Jedno od glavnih svojstava IgA jest sprječavanje vezanja bakterija i njihovih toksina na epitelne stanice, čime osiguravaju prvu liniju obrane protiv patogena. Većina IgA se sintetizira u području lamine proprije sluznice, tik ispod bazalne membrane gastrointestinalnog i respiracijskog epitela, suznih žlijezda, žlijezda slinovnica i dojki. Nalazi se i u sekretu genitourinarnog trakta i prostate. Molekule IgA u formi dimera aktivno se prenose na površinu sluznice procesom transcitoze u vezikulama, vezanjem za pIgR na epitelnim stanicama. Cijepanjem pIgR nastaje sekrecijska komponenta, koja ostaje kovalentno vezana za IgA dimer. Većina IgA, kakav se nalazi u izlučevinama (sekrecijski IgA), je u obliku dimera ili tetramera, vezanih dodatnim J lancima i sekrecijskom komponentnom. Sekrecijska komponenta štiti molekulu IgA od enzimske degradacije, pričvršćuje kompleks antigen-protutijelo na mukozni sloj, veže se za mucin povezujući ga poput ljepila i omogućava odstranjivanje patogena peristaltikom.



Slika 14. Molekula IgA. Preuzeto iz: Janeway's Immunobiology, 2017, Garland Science, USA (ref. 99)

J-lanac ili vezni lanac (prema eng. *joining*) je polipeptid molekulske mase 15kD, bogat cisteinom i strukturno potpuno drugačiji od drugih imunoglobulinskih lanaca.

U izvanstaničnom prostoru organizma molekule IgA se nalaze pretežno u monomernom obliku. Serumski IgA se veže za odgovarajući Fc-receptor, Fc α RI (CD89), koji se nalazi na površini granulocita, monocita i makrofaga (112). Vežanje imunokompleksa IgA i antigena za Fc α RI omogućuje fagocitozu, otpuštanje enzima i klirens imunokompleksa, citotoksične reakcije ovisne o protutijelima, degranulaciju eozinofila i pojačavanje fagocitoze. Molekula IgA ne aktivira komplement. IgA može inhibirati upalne efekte drugih imunoglobulina (113).

Ulazak antigena kroz sluznicu inducira odgovor imunološkog sustava lučenjem IgA. Pri tome ulazak i prolaz antigena putem vrčastih epitelnih stanica dovodi to

tolerancije, a prolazak antigena kroz međustanične prostore u pravilu inducira imunološki odgovor, posebice u mezenterijalnim limfnim čvorovima.

Za preživljavanje ljudi je važna funkcija IgA, izlučenih u mlijeku, koje se dojenjem unose u crijevo novorođenčeta s pomoću neonatalnog Fc-receptora (FcRn). Ta je molekula strukturno vrlo slična molekuli MHC I. Zajedno s transplacentarno prenesenim IgG molekulama, IgA osigurava zaštitu djeteta u periodu do samostalnog funkcioniranja njegovog imunološkog sustava. Za razliku od ljudskog mlijeka, kravlje mlijeko sadrži znatno manje koncentracije IgA, a većinom sadrži protutijela IgG.

Čini se kako povećana količina alergena-specifičnog IgA na površini sluznice ima utjecaj na neutralizaciju alergena na sluznici, prije nego što alergen dođe u kontakt s IgE. Pa ipak, većina osoba s manjkom IgA nema alergijske tegobe. Postoji mišljenje kako IgA ima ulogu u toleranciji alergena iz hrane i raste tijekom hiposenzibilizacije. Za obje tvrdnje se u literaturi mogu naći oprečni podaci. Neki autori smatraju kako prestanak senzibilizacije na bjelančevine jaja, nakon hiposenzibilizacije uslijedi s porastom titra sIgA, dok drugi autori nisu utvrdili takvu povezanost (114, 115). Slično je i s podacima o koncentraciji ukupnih IgA, koja je niža u djece s alergijom, dok drugi autori izvješćuju o višem titru (116).

Ligacija Fc α RI imunokompleksima koji sadržavaju IgA dovodi do pojačanja stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima, degranulacije eozinofila i bazofila te pojačanja fagocitoze. Osim s Fc α RI/CD89, IgA ulazi u interakcije s više različitih receptora, kao npr. s pIgR, transferinskim receptorom (CD71) i asijaloglikoproteinskim receptorom (ASGPR). Posljedice takvog povezivanja nisu do kraja jasne. Zanimljivo je kako Fc α RI omogućuje i inhibicijske i aktivacijske signale i stoga se smatraju važnim u očuvanju homeostaze i tolerancije na sluznici (117). Fc α RI se nalaze na mijeloidnim stanicama, uključujući dendritičke stanice (DC, prema eng. *dendritic cell*), monocite, makrofage, neutrofile i eozinofile. Signalizacija i rezultirajući stanični odgovor uzrokovan vezanjem IgA za Fc α RI ovisi o stanju molekule IgA. Proupalni odgovor je signaliziran vezanjem IgA molekule u imunokompleksu, za višestruke Fc α R (118). Protuupalni signal nastaje monovalentnim vezanjem Fc α RI za monomerni, slobodni IgA, što je najčešći oblik u serumu. Tada dolazi do inaktivacije i drugih receptora kao što su Fc γ R i Fc ϵ RI.

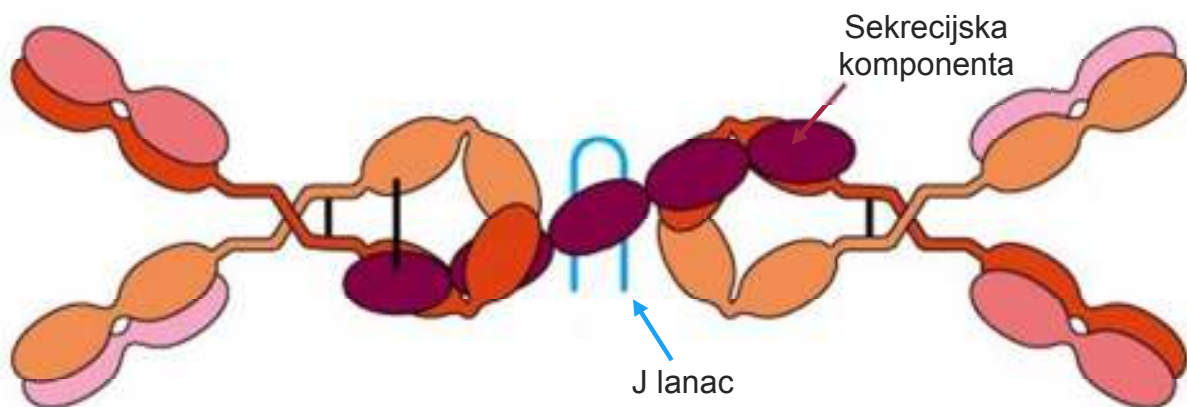
Tijekom liječenja alergijskih bolesti primjenom Fab-protutijela anti-Fc α RI, potisnute su manifestacije alergijske astme u Fc α RI transgeničnih miševa imuniziranih s anti-IgE

imunokompleksima. Nadalje, kod *in vitro* premoštenja Fc α RI na ljudskim dendritičkim stanicama dolazi do internalizacije IgA kompleksa i prezentacije antigena, što rezultira sazrijevanjem DC i proizvodnjom IL-10 (119). Vezanje IgA na monocite također uzrokuje produkciju IL-10, a inhibira upalne citokine IL-6 i TNF α .

Interesantno je kako bi teoretski bilo moguće inducirati „in situ“ izotipsko prekapčanje postojećih alergen-specifičnih IgE+ limfocita B u IgA2+ stanice, budući da je CH α 2 posljednji egzon „nizvodno“ od CH ϵ u ljudskom genomu za teški lanac. Prebacivanje proizvodnje alergen-specifičnih protutijela IgE na IgA2 bi rezultiralo neutralizacijom alergena u lumenu sluznice, prije nego što bi mogao doći u dodir s IgE. Iako to nije ispitano u praksi, ova pretpostavka se temelji na utjecaju IL-21 i TGF- β na IgA izotipsko prekapčanje i posljedičnu proizvodnju IgA2 u limfocitima B koji su već prošle izotipsko prekapčanje (120).

1.5.8. IgA1

Uglavnom se nalazi u serumu, u koncentraciji gotovo 10 puta većoj od IgA2. Od svih epitelnih površina, najzastupljeniji je u respiracijskom epitelu. U podjednakom omjeru s IgA2 se nalazi u epitelu tankog crijeva. Laki i teški lanci su povezani disulfidnim vezama. Razlikuju se od IgA2 molekula zahvaljujući drukčijem genu koji kodira zglobnu regiju. Zbog duplikacije aminokiselina i više vezanih oligosaharida ova regija je nešto šira, što dovodi do većeg razmicanja varijabilnih dijelova molekule. Zbog toga molekula može oblikovati različite kutove i poprimiti oblike od onih nalik na slovo Y, pa sve do slova T. Prednost ove različitosti i mogući razlog održanja takvoga gena jest ostvarivanje boljeg afiniteta za udaljenije antigene (121). Nedostatak ove osobine je veća otvorenost molekule, a time i veća osjetljivost na proteolitičke enzime patogena. Veći broj bakterija koje izazivaju učestale infekcije u ljudi (posebice *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*) iskorištavaju ovu slabost razvojem proteaza koji cijepaju IgA1 upravo u toj regiji (122). IgA1 uglavnom ne sudjeluju u aktivaciji komplementa. Međutim, ponekad aberantna glikozilacija i deficit O-povezanih oligosaharida unutar zglobne regije mogu aktivirati lekitinski i alternativni put komplementa, što se smatra dominantnim mehanizmom u bolesnika sa IgA nefropatijom. Deficit IgA1 i IgA2 je najčešći primarni oblik imunodeficijencije i najčešće prolazi asimptomatski.



Slika 15. Shematski prikaz molekule IgA1 u obliku dimera, sa sekrecijskom komponentom (preuzeto i modificirano iz Kuby Immunology, 6th edition, WH Freeman and Co., slika 4-19a)

1.5.9. IgA2

Uglavnom se nalazi na sluznicama kao tzv. sekrecijski IgA. Laki i teški lanci povezani su nekovalentnim vezama. U mukoznim limfnim tkivima (npr. gastrointestinalnom limfoidnom tkivu, GALT) proizvodi se u većoj količini nego u ostalim limfnim organima (npr. u slezeni ili perifernim limfnim čvorovima). Većinom se nalazi u kolonu. Otprilike podjednako s IgA1 ga nalazimo u tankom crijevu. Otporniji je na proteolizu od IgA1 zbog uže zglobne regije koja se ne može šire razmicati poput molekule IgA1.

1.5.10. IgG

Molekule IgG su najzastupljenije u organizmu i predstavljaju oko 75% svih molekula imunoglobulina. Uglavnom su funkcionalno vezane za izvanstanični prostor. Svi podtipovi imunoglobulina G su monomeri. Podrazredi se međusobno razlikuju po broju disulfidnih veza i duljini zgloba. Molekule IgG se jedine prenose transplacentarno, aktivnim prijenosom, također pomoću neonatalnog Fc-receptora. Izlučuje se zajedno s IgA u majčinom mlijeku osposobljujući tako nezreli humoralni imunitet novorođenčeta.

Teški lanac IgG molekula sastoji se od jedne varijabilne i 3 konstantne domene. Konstantnom regijom se IgG veže za Fc γ -receptore na makrofagima i neutrofilima, čime potiče fagocitozu. Visokoafinitetni Fc γ RI i Fc γ RII receptori se vežu u područje u blizini C γ 2 domene, dok su C γ 2 i C γ 3 domene uključene u vezanje za Fc γ RIII. Neki mikroorganizmi (npr. *Staphylococcus aureus*) proizvode proteine (protein A i G) sa sposobnošću vezanja na C γ 2 i C γ 3 domene, čime onemogućavaju vezivanje IgG za fagocite, što im omogućava preživljavanje.

Godine 1960. ustanovljena je podjela IgG molekula u četiri podrazreda koja se međusobno razlikuju strukturno i funkcionalno. Najizraženije su različitosti u aktiviranju komplementa i afinitetu vezanja na fagocitne receptore. Aminokiselinski slijed im je 95% podudaran. Sva četiri podrazreda IgG stupaju u interakciju s neonatalnim Fc-receptorima posteljice (FcRn) i prolaze u cirkulaciju fetusa. FcRn je strukturno sličan proteinima sistema leukocitnih antigena (HLA, prema eng. *human leukocyte antigen*), a veže IgG u području C γ 2 i C γ 3 domene.

IgG ima značajnu ulogu u citotoksičnoj reakciji ovisnoj o protutijelima. Nalaze se i intracelularno, gdje posreduju u intracelularnoj proteolizi ovisnoj o protutijelima, vezanjem na TRIM21 receptor (receptor s najvišim afinitetom za IgG u ljudi) s ciljem uklanjanja viriona u citosolu. Ima ulogu u reakcijama preosjetljivosti tipa II i III po Coombsu i Gellu.

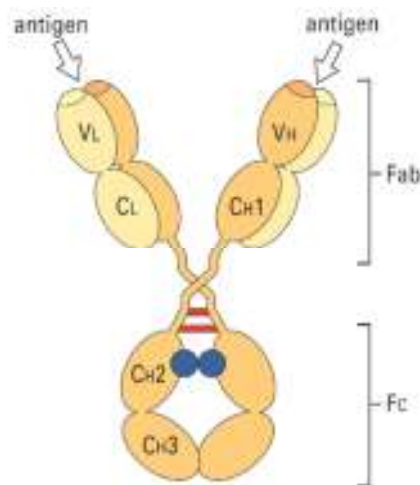
Imunodeficijencija svih IgG podrazreda zbog delecije svih gena na 14. kromosomu je vrlo rijetka.

1.5.11. IgG1

IgG1 čini oko 66% od ukupne količine IgG. Molekule IgG1 snažno aktiviraju komplement i time sudjeluju u uklanjanju mikroorganizama i antigena iz cirkulacije. Lako prolaze kroz posteljicu. NK-stanice posjeduju receptor $Fc\gamma RI$, što omogućava citotoksičnu aktivnost ovisnu o protutijelima. Obično nastaju kao odgovor na virusne infekcije. Neki autori su mišljenja kako IgG1 također mogu imati blokirajuću funkciju (123).

Zglobna regija IgG1 obuhvaća aminokiseline 216-231. Budući da su vrlo fleksibilni, Fab-fragmenti se mogu okretati oko svoje osi i kretati unutar sfere sa središtem na početku disulfidnih veza (124). U ljudi su poznata 4 alotipa.

Zbog visokog udjela u ukupnoj količini IgG, deficijencija ovog podrazreda imunoglobulina očituje se sniženom količinom ukupnih IgG. Nalazi se u 28% svih IgG deficijencija. Manifestira se rekurentnim infekcijama i sindromom kroničnog umora. Često je udružena s deficijencijom IgG3.



Slika 16. Molekula IgG1. Preuzeto iz: Janeway's Immunobiology, 2017, Garland Science, USA (ref. 99)

1.5.12. IgG2

Molekule IgG2 čine oko 23% od ukupne količine IgG-a. Najmanje od svih IgG molekula se prenose transplacentarno. Ne sudjeluju u opsonizaciji i slabo se vežu za FcR na fagocitnim stanicama. Čini se kako nastaju tek nakon inicijalne faze upalne reakcije. Kompeticijom s IgG1 smiruju upalnu reakciju, budući da slabije aktiviraju komplement. Obično nastaju kao odgovor na ugljikohidratne antigene.

Zglobna regija IgG2 je kraća od zglobne regije IgG1, koja ima 12 aminokiselinskih ostataka i četiri disulfidna mosta. Budući da nema glicinski ostatak, relativno je kratka i sadrži krutu poli-prolin dvostruku uzvojniju, dodatno stabiliziranu disulfidnim mostovima između teških lanaca. Ta svojstva ograničavaju fleksibilnost molekule IgG2 (125). U ljudi je poznat samo jedan alotip IgG2 molekule.

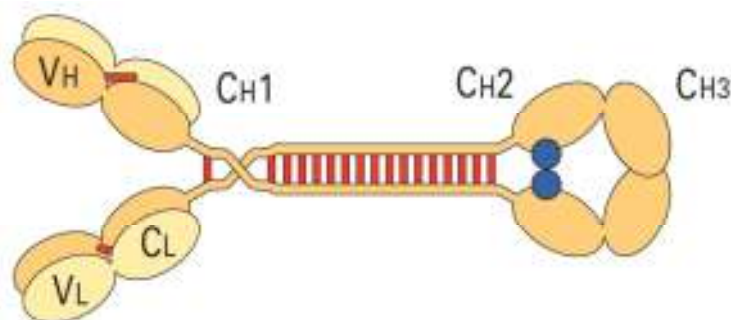
Zbog relativno visokog udjela u ukupnoj količini IgG, deficijencija ovog podrazreda imunoglobulina očituje se u oko polovice bolesnika sniženom količinom ukupnih IgG. Osobe sa selektivnom IgG2 imunodeficijencijom ne pokazuju značajnu kompromitaciju imuniteta, tek nešto češće sinobronhalne infekcije uzrokovane mikroorganizmima sa polisaharidnom ovojnicom. Imunodeficijencija IgG2 često je udružena sa deficijencijom IgG4. U novije vrijeme se prema prisutnosti međulančanih disulfidnih veza razlikuju podvrste IgG2: IgG2-A, IgG2-B i IgG2A/B.

1.5.13. IgG3

Molekule IgG3 čine svega 7% od ukupne količine IgG-a. Nastaju najranije u procesu izotipskog prekapčanja i stoga su obično niskog afiniteta. Od svih podrazreda IgG-a, upravo IgG3 najjače aktivira komplement. U ljudi je IgG3 najpolimorfija molekula, s 13 poznatih alotipova. Najlakše od svih IG molekula prelaze kroz posteljicu. Vežu se za receptor $Fc\gamma RIII$ (CD16) NK-stanica što omogućava citotoksičnu aktivnost ovisnu o protutijelima. Mastociti imaju također $Fc\gamma RIII$ receptor, putem kojeg mogu izazvati njihovu degranulaciju. Obično nastaju kao rezultat prisutnosti polisaharidnih antigena i odgovor na virusne infekcije (126).

IgG3 molekula se razlikuje od drugih podrazreda i svojom jedinstvenom produženom zglobnom regijom zbog čega je najfleksibilnije protutijelo. Zglobna regija je oko četiri puta duža u odnosu na onu od IgG1 i sadržava 62 aminokiseline (uključujući 21 prolina i 11 cisteina), tvoreći krutu poli-prolin dvostruku uzvojniju. Izduženi zglob u IgG3 doprinosi većoj molekularnoj težini u usporedbi s drugim podrazredima IgG (127). Zbog svoje duge zglobne regije IgG3 je najfleksibilnije protutijelo, ali i najmanje otporno na proteolizu te stoga ima kratak poluvijek, otprilike 7 dana.

Deficijencija ovog podrazreda imunoglobulina očituje se rekurentnim infekcijama donjeg dišnog trakta i kroničnim plućnim bolestima. Imunodeficijencija IgG3 često je udružena sa deficijencijom IgG1.



Slika 17. Molekula IgG3 molekula, s produljenom zglobnom regijom.
Preuzeto iz: Janeway's Immunobiology, 2017, Garland Science, USA (ref. 99)

1.5.14. IgG4

IgG su najmanje zastupljeni od svih molekula imunoglobulina i čine oko 4% od ukupne količine IgG-a u organizmu. Čini se kako nastaju najkasnije tijekom imunološke reakcije. Njihovu proizvodnju potiče prolongirana i/ili ponavljana stimulacija antigenima. Razina IgG4 je izrazito povišena u kroničnim parazitarnim infekcijama. Ne aktiviraju komplement niti sudjeluju u opsonizaciji jer se slabo vežu za Fc-receptore. Međutim, vežu se za inhibicijski Fc γ R1IB-receptor visokim (najjačim) afinitetom. Zglobna regija IgG4 kraća je od one u IgG1. Njena savitljivost se nalazi između one IgG1 i IgG2 molekule. U ljudi nisu poznati alotipovi IgG4 molekule.

Budući da nastaju posljednja od svih izotipova IgG, uslijed procesa somatske hipermutacije IgG4 imaju najveću specifičnost. Onemogućavaju ostale Ig-molekule u kompeticiji za vezanje na alergen. Osim toga, serumska blokirajuća protutijela IgG4 imaju sposobnost suzbijanja alergenom izazvane degranulacije bazofila i vezanje kompleksa IgE-alergen na limfocite B. Budući da ne aktiviraju komplement, ne potiču niti fagocitozu, pa djeluju protuupalno i dovode do smirivanja upalne i alergijske reakcije.

Pokazuju svojstvo disociranja monomera te formiranja hibridnih protutijela na način da se κ/λ molekula jedne specifičnosti odvaja od originalnog dimera teških lanaca i povezuje sa κ/λ druge specifičnosti. Time nastaju asimetrična protutijela sa dva različita epitopa. Važnost ove pojave u imunološkom odgovoru nije poznata. Ponekad se ponašaju kao monovalentno protutijelo. Lako prelaze kroz posteljicu. Zbog niskog udjela u ukupnoj količini IgG, deficijencija ovog podrazreda imunoglobulina nikada se ne očituje sniženjem ukupnih IgG. U zdrave djece IgG4 se nalaze u niskim, gotovo nemjerljivim koncentracijama. Nije sa sigurnošću dokazano kako niske razine IgG4 dovode do učestalijih respiracijskih infekcija.

U velikom broju studija zabilježen je porast IgG4 nakon hiposenzibilizacije (128). Više godina je poznato kako su razine sIgG u bolesnika s alergijom povišeni u nazalnom lavatu (129). Njihove koncentracije dodatno rastu nakon specifične imunoterapije genetski modificiranim alergenima, pri čemu je povećanje razine IgG4 značajno povezano sa smanjenjem nazalne osjetljivosti (130). U nekoliko istraživanja mehanizama specifične imunoterapije pokazalo se kako je omjer IgE/sIgG4 nakon

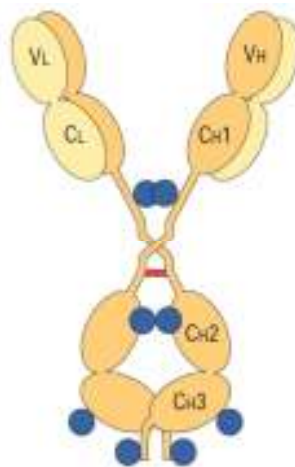
hiposenzibilizacije smanjen. Taj omjer povezan je sa smanjenjem kasne faze kožnih reakcija. Kasnije studije, međutim, nisu to potvrdile (131).

1.5.15. IgD

IgD molekule otkrivene su 1964. godine. Postoje samo u obliku monomera i do sada nije sa sigurnošću poznata njihova efektorska funkcija. IgD je biljeg zrele naivne B-stanice. Zrela B stanica započinje izražavati taj Ig u sekundarnim limfnim tkivima nakon izlaska IgM⁺ naivnih limfocita B iz koštane srži. Značajna količina IgD se nalazi s epitelne strane bazalne membrane (132), dok se manji dio nalazi u solubilnoj formi. Pojava IgD je filogenetski stara. Njena starost procjenjuje se na oko 500 milijuna godina. IgD protutijela nalazimo od riba do čovjeka (133). Gen za C δ regiju se nalazi u produžetku gena za C μ regiju. Miševi s isključenim genom za IgD ne pokazuju znakove imunodeficijencije, unatoč sniženim vrijednostima IgG1 i IgE.

Relativno veću prilagodljivost IgD uslijed povećane zglobne regije kompenzira smanjeni afinitet ovih protutijela za antigen. To je jasnije ukoliko znamo kako njihova tvorba i konačni antigenski repertoar nastaju prije procesa somatske hipermutacije.

Postoje indicije kako dio protutijela IgD nastaje izotipskim prekapčanjem s IgM na IgD u posebnoj skupini limfocita B u aerodigestivnoj sluznici. Takvi limfociti B osiguravaju identični repertoar protutijela IgM i IgD, a funkcija te pojave još nije do kraja jasna. IgD u submukozi osigurava zaštitu sluznice vezanjem za mnoge patogene. Cirkulirajući IgD se mogu vezati na mijeloidne stanice, prvenstveno bazofile. Indukcijom lučenje antimikrobnih i upalnih medijatora imaju određenu ulogu u regulaciji intenziteta upalne reakcije (134). Njihova koncentracija je u kroničnim upalama povišena (135).



Slika 18. Molekula IgD s oligosaharidnim jedinicama (označenima plavom bojom).
Preuzeto iz: Janeway's Immunobiology, 2017, Garland Science, USA (ref. 99)

1.6. Pregled dosadašnjih spoznaja o dinamici imunoglobulinskih razreda tijekom alergijskih reakcija

Uzroci i tijek imunološke reakcije na izloženost alergenima nisu do kraja poznati. Iako je relativno mnogo radova koji istražuju promjene razina izotipova alergen-specifičnih imunoglobulina u krvi i sekretima bolesnika s alergijom, radovi koji pokazuju fiziološku reakciju zdravih, nealergičnih pojedinaca, su malobrojni. Važno pitanje koje se pri tome postavlja jest kako se dihotomija Th1/Th2 upalnog odgovora odražava na dinamiku razreda i podrazreda imunoglobulina u bolesnika s alergijom, kao i u zdravih ispitanika tijekom izlaganja alergenu, npr. tijekom sezone polinacije.

Prema općenito prihvaćenom mišljenju, pojavi razreda imunoglobulina IgG, IgA i IgE prethodi aktivacija pomagačkih limfocita T (Th) i njihova polarizacija u Th1, Th2 ili Th17 smjer (136). U nastanku alergijske bolesti ključnim događajem smatra se prekapčanje imunološkog odgovora s IgG na IgE, što dovodi do stvaranja specifičnih sIgE odgovornih za nastanak simptoma bolesti. Do prije 10-ak godina prevladavalo je mišljenje kako su za usmjerenje imunološkog odgovora u specifične Th-skupine odgovorne podvrste dendritičkih stanica (41). Posljednjih godina postalo je jasnije da su za početak alergijske reakcije ključne one stanice koje prve dolaze u kontakt s alergenima, a to su epitelne stanice (137). Dosadašnjim studijama pokazani se brojni čimbenici koji utječu na polarizaciju upalnog odgovora koji rezultira izotipskim prekapčanjem B -limfocita u smjeru proizvodnje sIgE. Neki od važnijih su sljedeći:

- citokinski okoliš u kojem antigen-predočne stanice (APC, prema eng. *antigen presenting cells*) fagocitiraju antigen: prije svega lučenje TSLP, IL-25 i IL-33 iz oštećenih epitelnih stanica, a potom i lučenje IL-1 β i TNF- α (138, 139, 140);
- disfunkcija epitelnih stanica uzrokovana mutacijom strukturnih proteina, kao što je to pokazano na primjeru mutacije filagrina u bolesnika s atopijskim dermatitisom (50);
- put primjene alergena, npr. intranazalna i intraperitonealna primjena koje dovode do sinteze IgE, za razliku od intravenske i supkutane primjene koje dovode do porasta IgM, IgA i IgG (141);
- produžena stimulacija antigenom, čak i u zdravih ispitanika neatopijske konstitucije (142);
- transplacentarni prijenos alergena koji favorizira Th2-odgovor (143);

- podvrste stanica urođene imunosti (ILC, prema eng. *innate lymphoid cells*), prvenstveno ILC-2 (144, 145);
- podvrste dendritičkih stanica (41, 146) i njihovih kostimulacijskih molekula, prije svega B7.1 i B7.2 koje se vežu za molekule CD28 i CTLA-4 na limfocitima T, pri čemu jača kostimulacija promovira Th2-odgovor (147);
- aktivacija receptora urođene imunosti nalik Toll-u (TLR) (148);
- citokinski okoliš u vrijeme aktivacije limfocita Th i B, prije svega IL-4, IL-5 i IL-13, ali i L-12, pri čemu niske koncentracije IL-12 potiču Th-2 odgovor (149, 150, 151);
- izloženost Th-limfocita oslobođenom histaminu, što pospješuje proizvodnju Th2-citokina (IL-4, IL-5, i IL-13, ali i IL-10), inhibira proizvodnju Th1-citokina (152) i utječe na aktivaciju STAT1 i razvoj Th2-odgovora (153);
- kostimulacija limfocita Th putem Tec-receptora (razvoj Th1), odnosno Itk-receptora koji dovodi do proizvodnje IL-4 i Th2-odgovora (154);
- aktivacija u odsutnosti koreceptorskih signala i infektivnih organizama (131);
- jačina stimulacije T-staničnog receptora za antigen (155);
- genetički uvjetovan smanjeni kapacitet proizvodnje INF- γ , kao i poremećena proizvodnja IFN- β i IFN- δ posredovana receptorom TLR3 u djece atopijske konstitucije (156);
- virusne infekcije u ranoj dobi, oštećenje bronhalnog epitela i posljedično privlačenje dendritičkih stanica koje promoviraju Th2-tip imunološkog odgovora (157);
- utjecaj regulacijskih Treg FOXP3+ stanica putem lučenja IL-10 i TGF- β (158, 159, 160);
- urođeno smanjena aktivnost CD4+CD25+ regulacijskih Treg stanica, kao što je opisano u djece s atopijom, a što dovodi do Th17-polarizacije i lučenja IL-25, IL-21 i IL-22 (161, 162, 163);
- doprinos IL-17 indukciji Th2-odgovora, proizvodnji IgE i akumulaciji eozinofila (164);
- utjecaj memorijskih (Tmem) stanica koje imaju pojačan izražaj adhezijskih biljega LFA-1, CD2, LFA-3 i ICAM-1, kao i veću gustoću T-staničnog receptora za antigen (TCR); te stanice proizvode veće količine IL-2 kojim dovode do jače proliferacije Th1- i Th2-stanica;

- polimorfizam gena STAT6, što je predispozicijski čimbenik za nastanak alergijskih bolesti i povišene koncentracije IgE (165);
- mutacije tirozin kinaze 2 (TYK2, prema eng. *tyrosine kinase*) i prijenosnika signala i aktivatora prepisivanja 3 (STAT3, prema eng. *signal transducer and activator of transcription*), koje dovode do oštećenja u proizvodnji brojnih citokina signalnog puta, uključujući IFN- α , IL-6 i IL-12 (166);
- utjecaj folikularnih pomagačkih limfocita T (Tfh, prema eng. *T-follicular helper*) koji se u velikom broju nalaze na rubnim regijama folikula i germinalnih centara limfnih čvorova, gdje su pretežito smješteni limfociti B (168);
- mogućnosti „prirodne hiposenzibilizacije“ na alergene korova konzumacijom povrća koje sadrži križno-reaktivne proteine, indukcijom slgA u crijevima, ulaskom antigena kroz mikro-nabore stanica i prolaskom putem vrčastih stanica, pri čemu glavnu ulogu u indukciji i održavanju Th2-odgovora imaju plazmocitoidne dendritične stanice (pDC, prema eng. *plasmacytoid dendritic cell*) (169) i drugo.

Pregledom dostupne literature ne nalazi se istraživanja koja cjelovito i sistematično mjere „in vivo“ dinamiku svih podrazreda imunoglobulina prije i nakon fiziološkog izlaganja alergenu, niti u bolesnika s alergijom, niti u zdravih ispitanika.

Jedno od prvih istraživanja koje prati dinamiku specifičnih imunoglobulina u zdravih ispitanika, prije i nakon prirodnog izlaganju alergenu, jest ono Yungingera i sur. 1973. godine (170) u kojoj su mjereni samo slgE i slgG, bez određivanja podrazreda. Podrazredi IgG tada nisu bili niti poznati. Daleko je više istraživanja u kojima se promatrala dinamika ukupnih imunoglobulina pojedinih izotipova (171, 172). Prva mjerenja ukupnog IgG specifičnog za pelud biljke *Lolium perennae* (Lol p1) nalaze se u radovima Platts-Millsa (173) 1980-tih godina prošlog stoljeća, a potom i protutijela razreda IgA (174). Iako metoda za mjerenje alergenspecifičnih imunoglobulina G razreda nije ni do danas u potpunosti standardizirana, a uz to postoji i neujednačenost rezultata laboratorija koje koriste istu metodu, mnogi autori su bili mišljenja kako je prisutnost visokoafinitetnih protutijela razreda IgG na pročišćene antigene u IgE+ ispitanika bila isključivo karakteristika atopičnoga imunološkog odgovora (175). Zanimljivo je kako pojedini autori nisu uspjeli detektirati alergen-specifični slgG u svih osoba s alergijom. Tako je Hales našao slgG u 70% djece i svega 40% odraslih alergičnih na grinje (176).

Početak 21. stoljeća i uvođenjem anti-izotipskih protutijela počinju se pojavljivati radovi u kojima za određivanje specifičnih imunoglobulinskih izotipova koristila metoda ELISA (prema eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Više autora je mjerilo specifična protutijela raznih izotipova u zdravih pojedinaca koji su uglavnom bili kontrolna skupina. Pojedini autori su mjerili specifični slgG1-4, slgM i slgE, ali ne i slgA i slgD nakon izlaganja alergenu Phl p i Bet v (177). U istraživanju Keenove i suradnika (178) mjerene su razine slgA bez podjele na podrazrede. Više autora opisuje promjene razina slgE, slgG1, slgG2, slgG3, slgG4 nakon izlaganja peludnim alergenima, dok u zdravih ispitanika mjerenja nisu rađena (179, 180, 181). Od istraživanja koja su promatrale odgovor na alergen biljke *Ambrosia elatior*, nalazimo radove u kojima su mjerene razine slgG1 i IgG4 te sekrecijskih IgA (182, 183, 184, 185). U studiji Purohita i suradnika (izvan sezone polinacije) detektirani su IgE i IgG1-4, ali ne i IgA i IgM (186). U istraživanju Niederbergera i suradnika mjerena je dinamika nastajanja specifičnog Ig razreda M, G1-4 i E na pelud *Phleuma* u djece s alergijom tijekom prvih 7 godina života, pri čemu je primijećeno kako su slgM i IgG uglavnom nastajali nakon 3. godine života, dok su se slgE pojavljivala čak i prije te životne dobi (181). Istraživanje Kolopp-Sarde i suradnika (187) ustanovila je specifična protutijela IgA, IgG1-4 i IgM u serumu bolesnika preosjetljivih na kikiriki, a istraživanje Codine i sur. pokazala je prisutnost IgA, IgG1-4 i IgM u serumu bolesnika alergičnih na soju (188). Pri tome su slgG4 imala veći afinitet od slgE. Zhou i sur. (189) su pokazali postojanje IgA1 i IgG1-4 na kikiriki, škampe, soju, ribu i mlijeko u zdravih ispitanika, a Konstantinou IgG4 i IgA2 u zdravih ispitanika na alergene bjelanjka jaja (190). Postoje studije u kojima su istraživane ukupne razine IgA, IgG i IgM u slini i serumu bolesnika sa preosjetljivošću na alergen breze (191).

Mišljenja o prisutnosti alergen-specifičnih nealergijskih Ig podrazreda u zdravih ispitanika su također podijeljena. Neki autori navode odsutnost IgG (i IgA) na alergene u zdravih ispitanika, dok istovremeno navode njihovu prisutnost u drugim antigena, kao npr. tetanusa, otrova insekata, parazita i dr. (130). Činjenicu kako ti ispitanici ne pokazuju alergijske simptome autori pridaju visokoj razini „blokirajućih“ IgG4 protutijela. Drugi autori navode prisutnost IgG i IgA na alergene u zdravih pojedinaca, ali i da ta protutijela mogu dovesti do razvoja i pojačanja Th2-odgovora u zdravih (192). Zapravo je odnos upalnog i protuupalnog djelovanja IgG još teže

predvidiv budući je u ljudi do sada nađeno više vrsta IgG-receptora, onih s upalnim i onih s protuupalnim svojstvima (193).

U brojnim studijama promatrana je dinamika određenih podrazreda imunoglobulina nakon terapijskog postupka, npr. hiposenzibilizacije ili vakcinacije, pri čemu se nađena dinamika proglašavala uzročnom. Primjerice, nakon hiposenzibilizacije redovito se bilježi porast razine slgG4 u rasponu od 10 do 100 puta (194). Korelacija između povišenja slgG4 i povoljnog kliničkog ishoda zabilježena je u nekim, ali ne i svim istraživanjima. Tim jakim porastom tzv. „blokirajućih“ protutijela pokušava se objasniti učinkovitost hiposenzibilizacije, tj. mehanizam kompeticije slgG4 i slgE za alergen. Iako se porastom slgG4 ne dokazuje kauzalnost, već samo korelacija, učestalost takvih izvješća u literaturi se ne smanjuje (195, 196). Objavljeni dio rezultata ovog istraživanja pokazuje kako do porasta slgG4 dolazi i nakon prirodne ekspozicije alergenom, što pokazuje kako je porast slgG4 posljedica povećanog opterećenja alergenom i ne može biti mehanizam učinkovitosti specifične imunoterapije (197).

2. Hipoteza

Hipoteza rada je da zdravi ispitanici tijekom prirodne sezonske ekspozicije alergenu u sezoni polinacije biljke *Ambrosia elatior* stvaraju povećanu količinu specifičnih protutijela neatopijskih izotipova (prvenstveno IgA, IgM, IgG1, IgG2, IgG3), što do sada nije sistematično istraživano u dostupnoj literaturi.

Za razliku od njih, bolesnici preosjetljivi na polen biljke *Ambrosia elatior* će reagirati dominantno proizvodnjom specifičnih protutijela razreda IgE, što je u skladu s dosadašnjom saznanjima.

3. Ciljevi rada

Cilj rada je odrediti specifične imunoglobuline izotipova A1, A2, D, E, G1, G2, G3, G4 i M u zdravih ispitanika i bolesnika s atopijskom preosjetljivošću na pelud biljke *Ambrosia elatior* u dvije vremenske točke - prije sezone polinacije (tijekom lipnja) i tijekom vršne ekspozicije ispitanika peludi biljke *Ambrosia elatior* (tijekom rujna).

4. Ispitanici, materijali i metode

4.1. Opis istraživanja

Istraživanje je osmišljeno kao prospektivno, s dvije skupine ispitanika: bolesnika s alergijskim bolestima dišnih puteva (alergijski rinitis i astma) preosjetljivih na pelud biljke *Ambrosia elatior* i kontrolne skupina zdravih ispitanika, bez atopije.

Ispitivanje je slijedilo opća medicinsko-etička načela i načela dobre medicinske prakse. Istraživanje su odobrila Etička povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice „Sveti Duh“.

Ispitanici su nakon upoznavanja s ciljevima i metodama rada potpisali informirani pristanak. Klinički dio ispitivanja (anamneza, pregled bolesnika, potpisivanje informiranog pristanka, kožni alergološki testovi, uzimanje uzoraka krvi, odvajanje seruma, zamrzavanje i čuvanje uzoraka) proveden je u Odjelu za kliničku imunologiju, reumatologiju i pulmologiju Kliničke bolnice „Sveti Duh“ u Zagrebu. Određivanje razine specifičnih protutijela izvršeno je u Odjelu za preradu ljudske plazme Imunološkog zavoda u Zagrebu.

Ispitanicima su izvan sezone polinacije biljke *Ambrosia elatior* učinjeni kožni testovi i određene razine specifičnih imunoglobulina (izotipovi IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgM i IgE). *In vitro* testovi su ponovljeni u sezoni polinacije biljke *Ambrosia elatior* tijekom perioda vršne koncentracije peludi u zraku, a na temelju javnih podataka Zavoda za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar. Dobiveni rezultati su uspoređeni i analizirani aritmetičkim deskriptivnim i statističkim metodama.

4.2. Ispitanici

4.2.1. Bolesnici s atopijom

Skupinu bolesnika činilo je 24 odraslih osoba s alergijskim bolestima dišnih puteva (alergijskim rinitisom i astmom). Kriteriji za uključivanje ispitanika s atopijom bili su: starost od 18-65 godina, stalni boravak na području zapadnog dijela grada Zagreba, sezonska pojava simptoma alergijskih bolesti tijekom barem dvije protekle godine, pozitivan kožni test na pelud biljke *Ambrosia elatior* (urtika veličine pozitivne kontrole - histamina ili veća), povišena razina ukupnog IgE (>122kU/l), povišena razina

specifičnog IgE na pelud biljke *Ambrosia elatior* (razred 3-6, mjereno metodom ImmunoCAP®). Kriteriji za isključivanje ispitanika s atopijom bili su: provedena hiposenzibilizacija na neki od alergena, pozitivan kožni test na ostale standardne inhalacijske alergene (korove, stabla, trave, kućnu prašinu, gljivice, dlaku životinja) ili pufer, kao i uzimanje topičkih ili sistemskih kortikosteroida.

4.2.2. Kontrolna skupina

U kontrolnu skupinu uključena su 24 zdrava odrasla ispitanika. Kriteriji za uključivanje zdravih ispitanika bili su: starost od 18-65 godina, stalni boravak na području zapadnog dijela grada Zagreba, odsutnost simptoma alergijskih bolesti u anamnezi i užoj obitelji (majka, otac, brat, sestra, djeca), negativan kožni test na standardne inhalacijske alergene (pelud biljke *Ambrosia elatior*, korove, stabla, trave, kućnu prašinu, gljivice i dlaku životinja) i razina ukupnog IgE unutar razine zdrave populacije (<122kU/l). Kriterij za isključivanje zdravih ispitanika je bio postojanje bilo koje kronične bolesti koja je zahtijevala trajnu medikamentoznu terapiju.

4.3. Plan rada

Nakon upoznavanja s planom i metodama rada, ispitanici su potpisali informirani pristanak. Svim ispitanicima je učinjen kožni test standardiziranom ubodnom „prick“-metodom alergenskim ekstraktom biljke *Ambrosia elatior*, kao i alergenima korova, stabala, trava, kućne prašine, plijesni i dlake životinja. Nakon 15 minuta očitana je kožna reakcija i uspoređena s pozitivnom kontrolom (histamin) i negativnom kontrolom (pufer).

Ispitanicima je prije sezone polinacije biljke *Ambrosia elatior* u lipnju 2007. punkcijom periferne vene uzeto 5 ml krvi. Serum je odvojen centrifugiranjem (5 minuta na 3000 okretaja/min) i zamrznut na -20°C. Uzimanje krvi ponovljeno je tijekom sezone polinacije biljke *Ambrosia elatior* sredinom rujna 2007. godine, nakon informacije o početku vršne koncentracije peludi AE na području grada Zagreba, a prema podacima Instituta za medicinska istraživanja u Zagrebu koji redovito vrši kontinuirana mjerenja. Serum je ponovno odvojen centrifugiranjem i zamrznut na -20°C.

Nakon odmrzavanja seruma ispitanika i priređivanja odgovarajućih otopina prema unaprijed definiranim razrjeđenjima, razine imunoglobulina specifičnih za pelud biljke

Ambrosia elatior određene su enzimskim imunotestom ELISA. Korištene su mikrotitarske pločice s konjugiranim alergenom peludi biljke Ambrosia elatior. Nakon inkubacije seruma ispitanika s alergenom u jažicama mikrotitarske pločice ispran je suvišak protutijela. U odvojene jažice dodana su sekundarna protutijela na sve izotipove imunoglobulina (IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgM, IgE), obilježena peroksidazom odn. alkalnom fosfatazom. Nakon dodatka supstrata za peroksidazu, odnosno alkalnu fosfatazu spektrofotometrijski su određene razine specifičnih imunoglobulina svih izotipova. Testovi su rađeni u duplikatu.

4.4. Kožni test ubodnom („prick“) metodom

Na dezinficiranu kožu podlaktice ispitanika nanosena je prema uputi proizvođača (Allergopharma, Reinbek, Njemačka) po jedna kapljica alergenskog ekstrakta i to redom kako slijedi: otopine histamina, pufera, ekstrakta peludi biljke Ambrosia elatior, korova, stabala, trava, kućne prašine, plijesni i dlake životinja. Kroz svaku kapljicu je posebnom lancetom površinski ubodena koža. Nakon uboda višak tekućine je odstranjen upijanjem papirom. Nakon 15 minuta očitana je reakcija mjerenjem promjera nastalih urtika. Promjer okolnog crvenila je zanemaren. Pozitivnom reakcijom procijenjen je nastanak urtike veličine pozitivne kontrole (histamina) ili veće, uz negativnu reakciju na pufer.

4.6. Imunotest ELISA

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

- natrij-hidrogenkarbonat, natrij-karbonat, glicin, Tris (hidroksimetil) aminometan, natrij-klorid, koncentrirana kloridna kiselina, natrij-dihidrogenfosfat-dihidrat, dinatrij-hidrogenfosfat, Tween 20 (polioksietilensorbitanmonolaurat), natrij-azid, limunska kiselina, vodikov peroksid i sumporna kiselina, mertiolat (Kemika, Zagreb);
- goveđi serumski albumin (BSA, prema eng. *bovine serum albumine*), ortofenilendiamin (OPD) i p-nitrofenilfosfat (p-NPP) (Sigma Company, St. Louis, SAD);
- purificirani ekstrakt peludi biljke Ambrosia elatior (Imunološki zavod, Zagreb);
- protutijela na razrede i podrazrede ljudskih imunoglobulina konjugirana s peroksidazom (HRP) ili alkalnom fosfatazom (ALP): IgE (anti-IgG-HRP), IgG1

(anti-IgG-HRP), IgG2 (anti-IgG-HRP), IgG3 (anti-IgG-ALP), IgG4 (anti-IgG-ALP), IgA1 (anti-IgG-ALP), IgA2 (anti-IgG-ALP), IgD (anti-IgG-ALP) (Abcam, Cambridge, Velika Britanija).

Za pripremu 0,1 molarnog karbonatnog pufera pripremljene su dvije otopine. Prva otopina sastojala se od 0,84g NaHCO₃ otopljenih u 100 mL vode. Druga otopina se sastojala od 1,06g Na₂CO₃ otopljenih u 100 mL vode. Karbonatni pufer pripremljen je miješanjem 74 mL prve otopine i 26 mL druge otopine. Za pripremu blokirajućeg pufera pomiješano je 7,5 g glicina, 3,03 g Tris (hidroksimetil) aminometana, 4,39 g NaCl te nadopunjeno vodom do količine od 500 mL, uz titraciju koncentriranom otopinom HCl do pH 7,5. Za pripremu fosfatnog pufera otopljeno je 2,496 g NaH₂PO₄ i 11,924 g Na₂HPO₄ u 1000 mL vode. Za pripremu otopine za ispiranje odmjereno je 200 mL 0,1M fosfatnog pufera, dodano 20 mL 10% NaCl i deterdženta 0,1% Tween 20 te razrijeđeno vodom 20 puta. Za pripremu otopine za razrjeđivanje seruma ispitanika odmjereno je 250 mL 0,1 M fosfatnog pufera i dodano 2,25g 0,9% NaCl, 25mg 0,01% NaN₃ te dopunjeno vodom do volumena od 250 mL. Za pripremu otopine za konjugat odmjereno je 100 mL 0,025 M fosfatnog pufera, dodano 2,0 g NaCl, 1g BSA i 10mg 0,01% mertiolata. Priređeno je 9 bočica takve otopine. U svaku bočicu je dodano po 5 µL sekundarnog protutijela - imunoglobulina usmjerenog na jedan od devet izotipova humanog imunoglobulina. Za pripremu medija za supstrat OPD odmjereno je 0,47g limunske kiseline, dodano 0,91g Na₂HPO₄ i otopljeno u 100ml vode. Za pripremu otopine supstrata za alkalnu fosfatazu odmjereno je 0,91g p-NPP te razrijeđeno u 100ml vode. Za zaustavljanje reakcije enzima korištena je 3 M otopina NaOH.

Vežanje alergena za mikrotitarske pločice priređeno je na sljedeći način: u 100 mL svježe pripremljenog 0,1 M karbonatnog pufera dodano je 100 ml ekstrakta peludi biljke *Ambrosia elatior* (1000 AU/ml) i dobro promiješano. Nakon toga je automatskom pipetom u svaku jažicu mikrotitarske pločice dodano po 100 µL otopine tako pripremljene otopine alergena. Pločice su pokrivene i inkubirane na sobnoj temperaturi preko noći (16 sati) kako bi se alergen adsorbirao na dno jažica mikrotitarskih pločica. Sljedeći dan su jažice isprane 3 puta puferom za ispiranje (3 x 300 µL), nakon čega je u svaku jažicu dodano po 300 µL blokirajućeg pufera kako bi se zasitila preostala slobodna mjesta na plastici. Pločica je inkubirana tijekom 3 sata na sobnoj temperaturi. Pločice su ponovno isprane tri puta puferom za ispiranje

(3x300 μ L), ostavljene preko noći na sobnoj temperaturi zatvorene poliamidnom te konačno pohranjene na -20 °C do uporabe. Na opisani način mikrotitarske pločice su se mogle čuvati nekoliko mjeseci.

Neposredno prije izvođenja imunotesta ELISA, a prema iskustvima i rezultatima dobivenim u predanalitičkoj fazi, priređena su razrjeđenja seruma ispitanika puferom za ispiranje i to:

- 1:100 i 1:1000 za određivanje IgM,
- 1:10 i bez razrjeđenja za određivanje ostalih izotipova alergenspecifičnih imunoglobulina.

Za određivanje protutijela na pelud biljke *Ambrosia elatior* primijenjen je indirektni imunoenzimski test. Metodu su koristili drugi autori za određivanje slg razreda E, A i G (198). Načelo indirektnog imunotesta ELISA jest sljedeće:

- u prvom stupnju, za antigen (pelud biljke *Ambrosia elatior*) vezan za čvrstu fazu u jažicama mikrotitarskih pločica, vežu se tijekom prve inkubacije specifična protutijela iz seruma ispitanika pri čemu nastaje kompleks antigen-protutijelo;
- u drugom stupnju kompleks antigen-protutitijelo reagira sa sekundarnim protutijelom (mišji anti-humani izotipski imunoglobulin) konjugiranim s enzimom (peroksidazom, odnosno alkalnom fosfatazom) stvarajući novi imunokompleks vezan za podlogu, tj. dno jažice mikrotitarske ploče;
- dodatkom supstrata za peroksidazu, ortofenilendiamina (OPD), odnosno supstrata za alkalnu fosfatazu, p-nitrofenilfosfata (p-NPP) nastaje obojena otopina, a intenzitet obojenja određuje se spektrofotometrijski.

Na ranije pripremljene mikrotitarske pločice s vezanim alergenom peludi biljke *Ambrosia elatior* pipetom je u svaku jažicu dodano po 100 μ L seruma svakog ispitanika te inkubirano tijekom 120 minuta na temperaturi od 37,1°C. Nakon trostrukog ispiranja pločice s 300 μ l otopine za ispiranje, u svaku jažicu je dodano po 100 μ L otopine odgovarajućeg sekundarnog anti-izotipskog protutijela (anti-IgA1, anti-IgA2, anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3, anti-IgG4, anti-IgD, anti-IgM, anti-IgE) konjugiranog s enzimom i inkubirano kroz sljedećih 120 minuta na temperaturi od 37,1°C. Nakon ponovnog trostrukog ispiranja pločice s 300 μ L otopine za ispiranje, u

svaku je jažicu dodano po 100 μ L odgovarajućeg enzimskog supstrata i ponovno inkubirano kroz 30 minuta u tami. Po isteku 30 minuta kromogena reakcija je prekinuta dodatkom 100 μ L otopine za zaustavljanje reakcije. Apsorbancija, odnosno optička gustoća sadržaja svake jažice očitana je spektrofotometrom (Perkin Elmer, Ohio, SAD) na valnim duljinama od 492 nm (supstrat za peroksidazu OPD) i 405 nm (supstrat za alkalnu fosfatazu NPP) uz filter od 620 nm. U statističkoj analizi i raspravi korištene su vrijednosti očitanih apsorbancija za svaki izotip ljudskog imunoglobulina.

4.7. Statističke metode

Za opisivanje ispitivanih skupina korištene su deskriptivne statističke metode (aritmetička sredina, raspon, standardna devijacija). Svaka kontinuirana varijabla je bila testirana na normalnost distribucije.

Dobiveni rezultati razine specifičnih protutijela u sezoni i izvan sezone polinacije analizirani su neparametrijskim testovima (Mann-Whitney za nezavisne i Wilcoxon test za zavisne uzorke). Dinamičke promjene varijabli prikazane su grafički.

5. Rezultati

Ispitivanu skupinu sačinjavala su 24 bolesnika preosjetljiva na pelud biljke *Ambrosia elatior*, od čega 12 žena i 12 muškaraca, prosječne starosti $36,13 \pm 11,1$ godina. U kontrolnoj skupini bilo je 24 zdravih ispitanika, od čega 14 žena i 10 muškaraca prosječne starosti $37,17 \pm 10,18$ godina. Skupine se nisu značajno razlikovale ni po spolu niti po dobi.

Tablica 5. Demografski podaci ispitanika

	Bolesnici s atopijom	Kontrolna skupina
n	24	24
Muškarci	12	10
Žene	12	14
Prosječna starost (godine)	$36,1 \pm 11,1$	$37,2 \pm 10,18$

Izmjerene vrijednosti apsorbancije u imunotestu ELISA za sve izotipove imunoglobulina u ispitanika kontrolne skupine prikazuje tablica 6, a bolesnika s atopijom tablica 7.

Tablica 6. Izmjerene vrijednosti apsorbancije za pojedine izotipove imunoglobulina kontrolne skupine (n=24)

	Minimum		Maksimum		Prosjek		SD	
	PS	US	PS	US	PS	US	PS	US
slgM	1,03	0,88	3,38	3,36	2,00	1,95	±0,61	±0,59
slgE	0,1	0,09	0,37	0,41	0,18	0,19	±0,08	±0,07
slgG1	0,14	0,14	4,44	4,34	1,18	1,11	±1,39	±1,32
slgG2	0,22	0,21	2,93	3,28	0,45	0,44	±0,53	±0,61
slgG3	0,16	0,15	3,73	3,71	0,60	0,58	±0,80	±0,78
slgG4	0,15	0,13	4,21	4,19	0,62	0,63	±0,90	±0,92
slgA1	0,28	0,31	2,43	2,62	0,90	0,89	±0,47	±0,55
slgA2	0,17	0,15	0,51	0,55	0,27	0,27	±0,10	±0,11
slgD	0,09	0,10	0,25	0,21	0,12	0,12	±0,03	±0,02

Legenda: PS, prije sezone polinacije; US, u sezoni polinacije

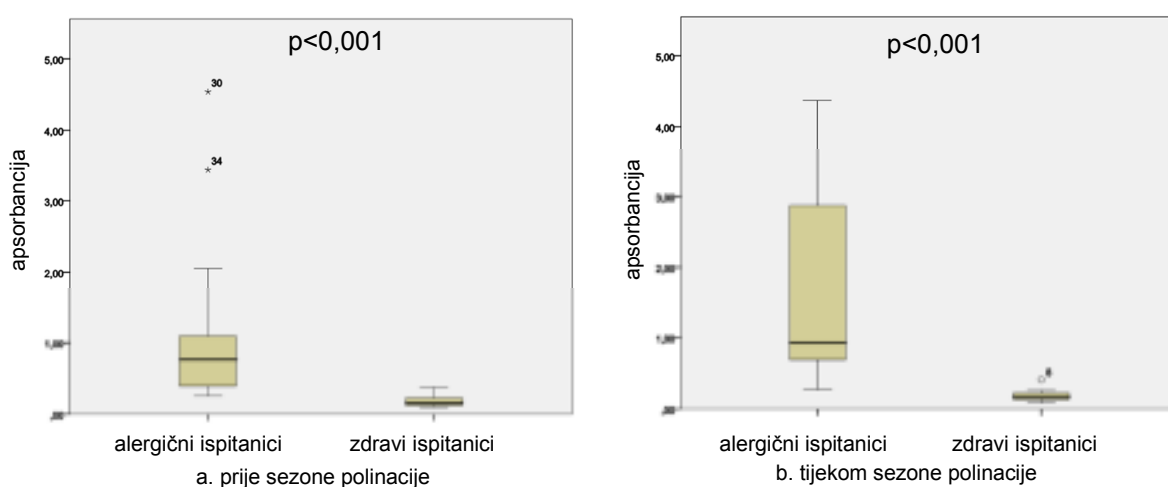
Tablica 7. Izmjerene vrijednosti apsorbancije za pojedine izotipove imunoglobulina u skupini bolesnika preosjetljivih na polen biljke *Ambrosia elatior* (n=24)

	Minimum		Maksimum		Prosjek		SD	
	PS	US	PS	US	PS	US	PS	US
slgM	1,08	1,10	3,37	3,35	1,99	1,98	±0,57	±0,57
slgE	0,25	0,27	4,54	4,37	1,03	1,65	±1,02	±1,38
slgG1	0,16	0,15	4,41	4,59	0,95	0,98	±1,13	±1,21
slgG2	0,15	0,14	0,74	0,74	0,41	0,43	±0,15	±0,15
slgG3	0,12	0,14	3,34	3,15	0,44	0,47	±0,66	±0,64
slgG4	0,14	0,19	2,88	3,64	0,68	0,94	±0,76	±1,01
slgA1	0,11	0,10	3,75	3,84	1,08	1,25	±0,71	±0,81
slgA2	0,11	0,17	1,00	1,29	0,35	0,40	±0,23	±0,26
slgD	0,10	0,10	0,17	0,18	0,13	0,11	±0,02	±0,02

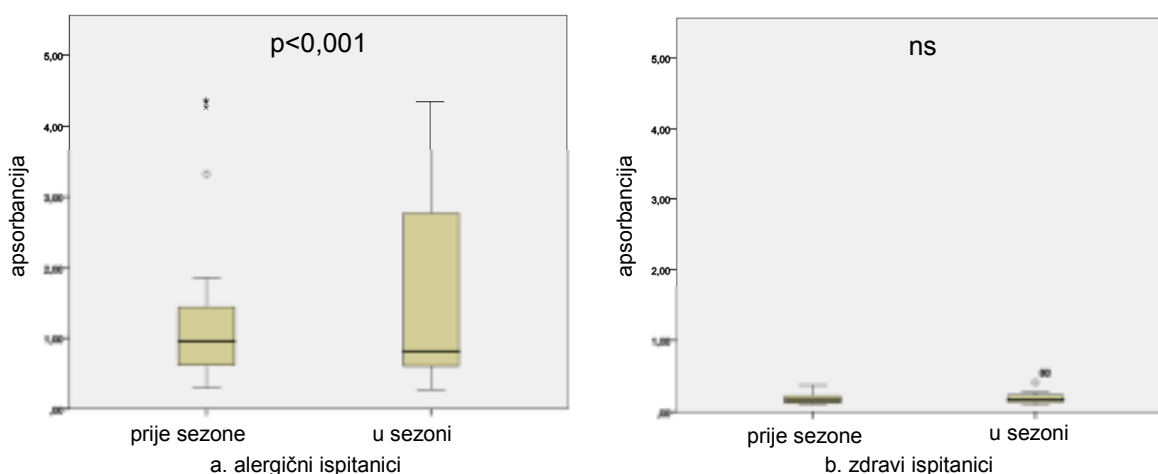
Legenda: PS, prije sezone polinacije; US, u sezoni polinacije

5.1. Promjene alergjen-specifičnih IgE (slgE)

Razine slgE (izražene vrijednostima apsorbancije u imunoenzimskom testu ELISA) bile su izrazito bipolarno raspodijeljene u ispitivanim skupinama, što je u skladu s dizajnom studije i očekivanjima. Srednja vrijednost razine slgE u bolesnika prije sezone polinacije iznosila je $1,03 \pm 1,02$ prema svega $0,18 \pm 0,07$ u kontrolnoj skupini (tablice 6 i 7, slika 19). Razlika između skupina prije sezone polinacije i u sezoni polinacije bila je značajna ($p < 0,001$) (Slika 19). U sezoni polinacije je došlo do porasta razine slgE u ispitivanoj skupini na $1,65 \pm 1,38$ ($p < 0,001$), za razliku od kontrolne skupine u kojoj nije došlo do promjene razine slgE ($0,19 \pm 0,07$) (Slika 20).



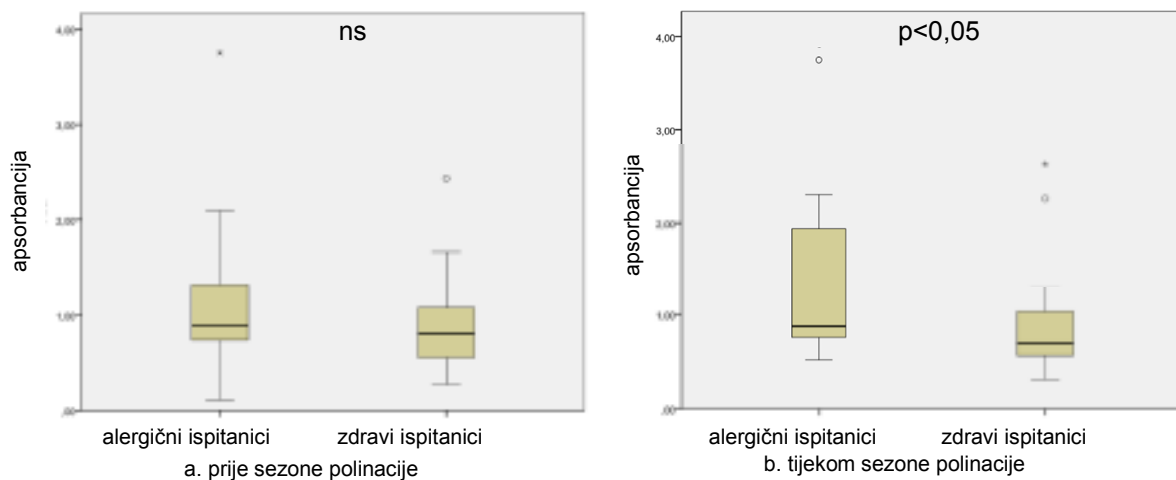
Slika 19. Usporedba razine alergjen-specifičnog IgE (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) između bolesnika s atopijom i ispitanika kontrolne skupine prije i tijekom sezone polinacije biljke *Ambrosia elatior*



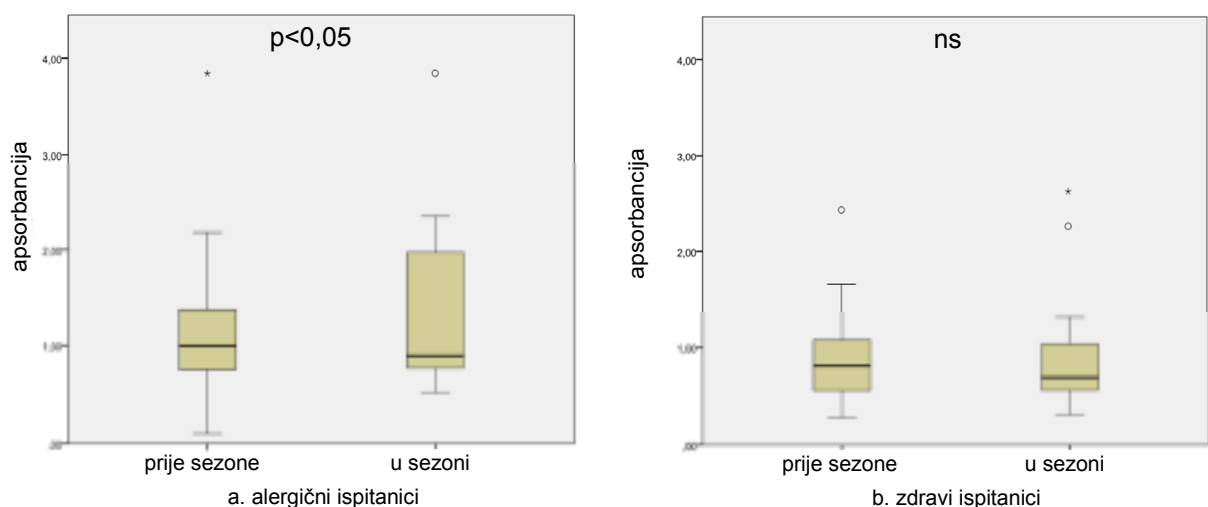
Slika 20. Usporedba razine alergjen-specifičnog IgE (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) u bolesnika s atopijom (u predsezoni i sezoni) i ispitanika kontrolne skupine (u predsezoni i sezoni polinacije biljke *Ambrosia elatior*)

5.2. Promjene alergena-specifičnih IgA₁ (slgA₁)

Srednja vrijednost razine slgA₁ u bolesnika prije sezone polinacije iznosila je $1,08 \pm 0,71$ i nije bila značajno različita od razine kontrolne skupine ($0,90 \pm 0,47$) (tablice 6 i 7, slika 21). U sezoni polinacije došlo je do značajnog porasta razine slgA₁ u bolesnika ($1,25 \pm 0,81$, $p < 0,01$) (Slika 22). Dakle, razlika između skupina u vremenu prije sezone polinacije nije bila statistički značajna, dok je u sezoni polinacije razlika bila značajna ($p < 0,05$). Tijekom sezone polinacije u kontrolnoj skupini došlo je do blagog sniženja slgA₁ ($0,89 \pm 0,55$), ali razlika nije bila statistički značajna.



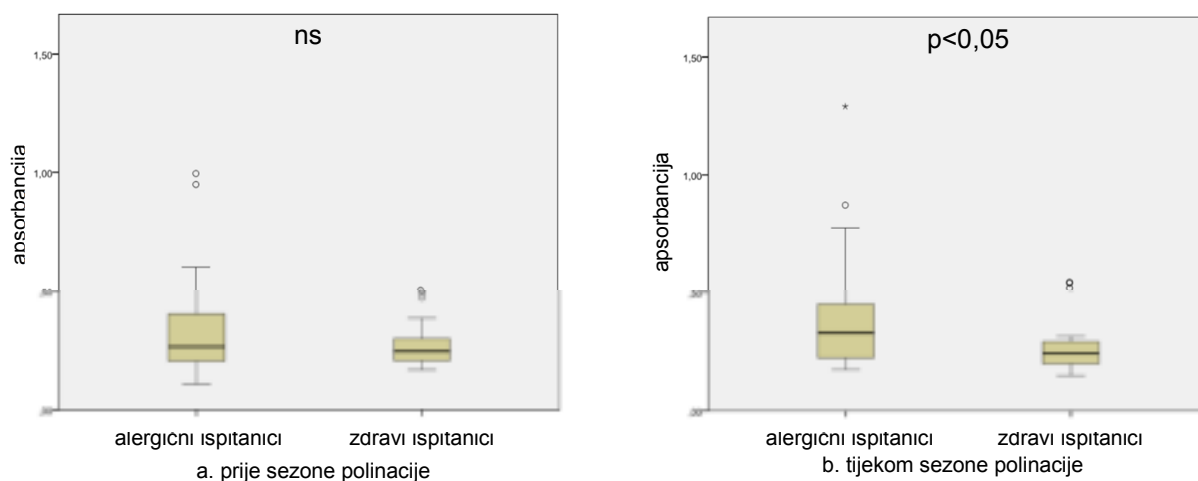
Slika 21. Usporedba razine alergena-specifičnog IgA₁ (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) između bolesnika s atopijom i ispitanika kontrolne skupine prije i tijekom sezone polinacije biljke *Ambrosia elatior*



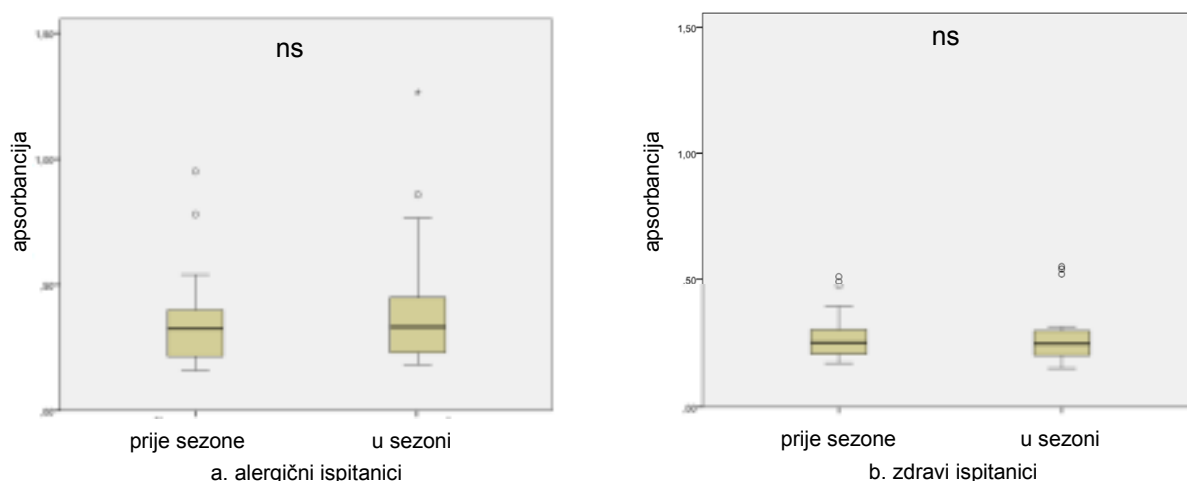
Slika 22. Usporedba razine alergena-specifičnog IgA₁ (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) u bolesnika s atopijom (u predsezoni i sezoni) i ispitanika kontrolne skupine (u predsezoni i sezoni polinacije biljke *Ambrosia elatior*)

5.3. Promjene alergjen-specifičnih IgA₂ (slgA₂)

Srednja vrijednost razine slgA₂ u bolesnika, prije sezone polinacije, iznosila je $0,35 \pm 0,23$ i nije bila značajno različita od razine kontrolne skupine ($0,27 \pm 0,10$) (tablice 6 i 7, slika 23). U sezoni polinacije razina slgA₂ u bolesnika je blago porasla i bila statistički značajno viša od kontrole ($0,40 \pm 0,26$ prema $0,27 \pm 0,11$, $p < 0,05$). U kontrolnoj skupini je tijekom sezone polinacije razina slgA₂ ostala nepromijenjena ($0,27 \pm 0,11$) (Slika 24).



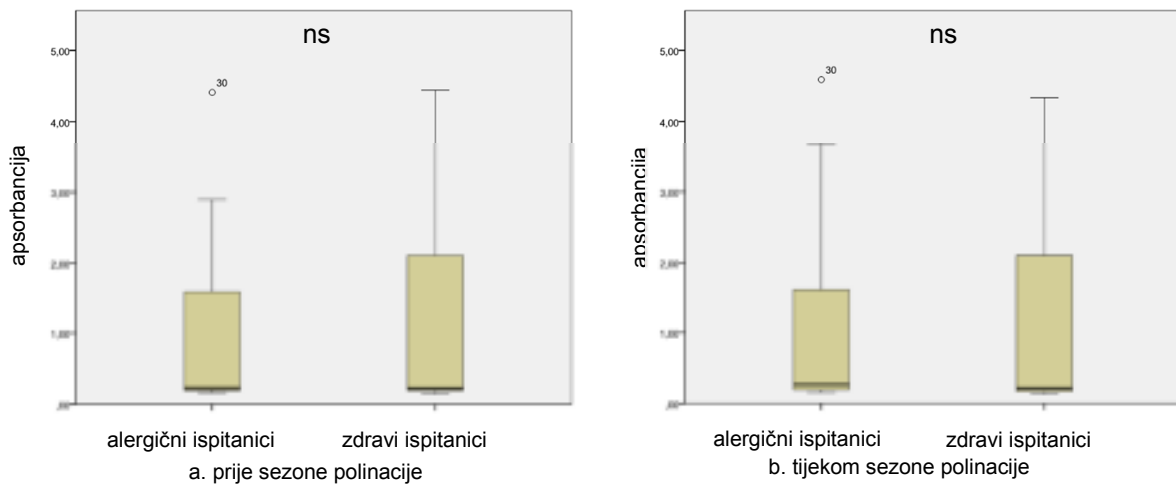
Slika 23. Usporedba razine alergjen-specifičnog IgA₂ (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) između bolesnika s atopijom i ispitanika kontrolne skupine prije i tijekom sezone polinacije biljke *Ambrosia elatior*



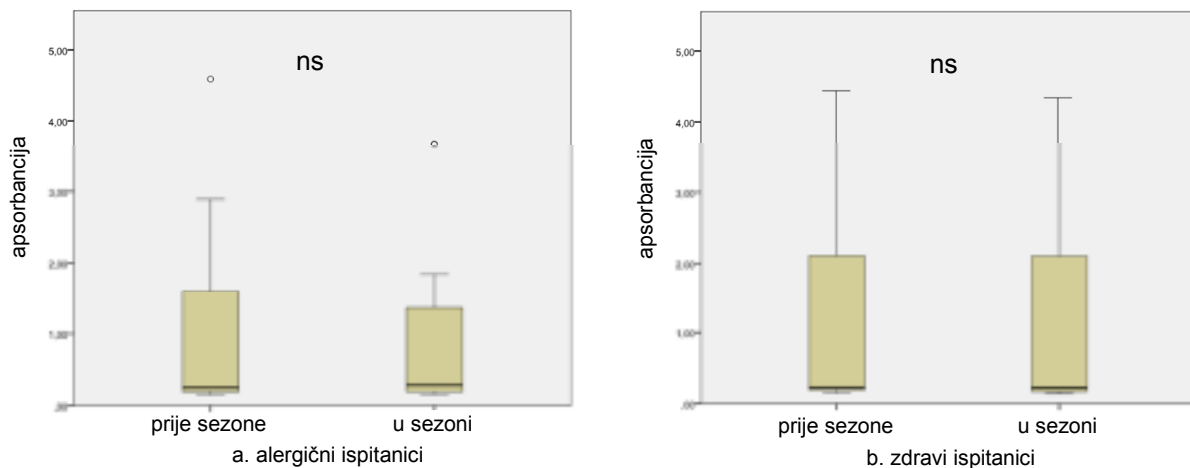
Slika 24. Usporedba razine alergjen-specifičnog IgA₂ (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) u bolesnika s atopijom (u predsezoni i sezoni) i ispitanika kontrolne skupine (u predsezoni i sezoni polinacije biljke *Ambrosia elatior*)

5.4. Promjene alergjen- specifičnih IgG₁ (slgG₁)

Srednja vrijednost razine slgG₁ nije se statistički razlikovala između bolesnika i kontrolne skupine, prije polinacije ($0,95 \pm 1,13$ vs. $1,18 \pm 1,39$) kao niti tijekom polinacije ($0,98, \pm 1,21$ vs. $1,11 \pm 1,32$, tablice 6 i 7, slike 25 i 26).



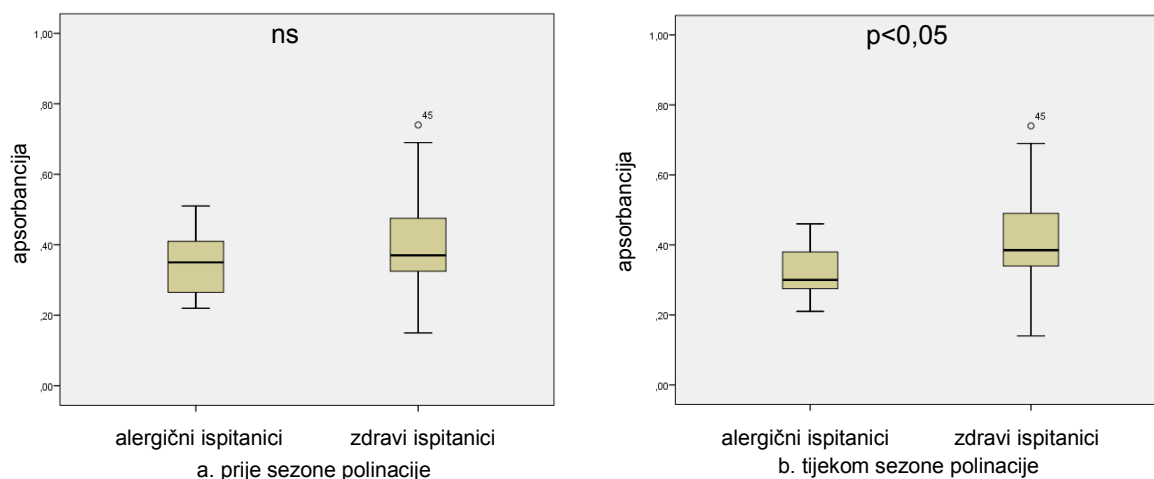
Slika 25. Usporedba razine alergjen-specifičnog IgG1 (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) između bolesnika s atopijom i ispitanika kontrolne skupine prije i tijekom sezone polinacije biljke *Ambrosia elatior*



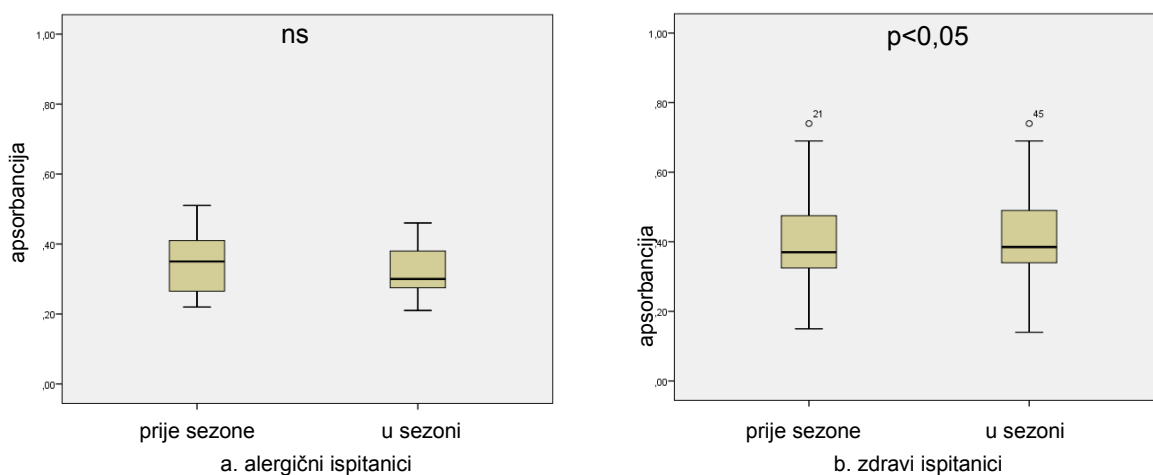
Slika 26. Usporedba razine alergjen-specifičnog IgG1 (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) u bolesnika s atopijom (u predsezoni i sezoni) i ispitanika kontrolne skupine (u predsezoni i sezoni polinacije biljke *Ambrosia elatior*)

5.5. Promjene alergena- specifičnih IgG₂ (slgG₂)

Srednja vrijednost razine slgG₂ u bolesnika prije sezone polinacije iznosila je 0,41 ±0,15 i nije se značajno razlikovala od kontrole (0,45±0,53). U sezoni polinacije je došlo do blagog porasta razine slgG₂ u bolesnika (0,43±0,15) i statistički značajnoga pada slgG₂ u skupini zdravih ispitanika (0,44±0,61), što je dovelo do statistički značajne razlike između skupina (tablice 6 i 7, slike 27 i 28).



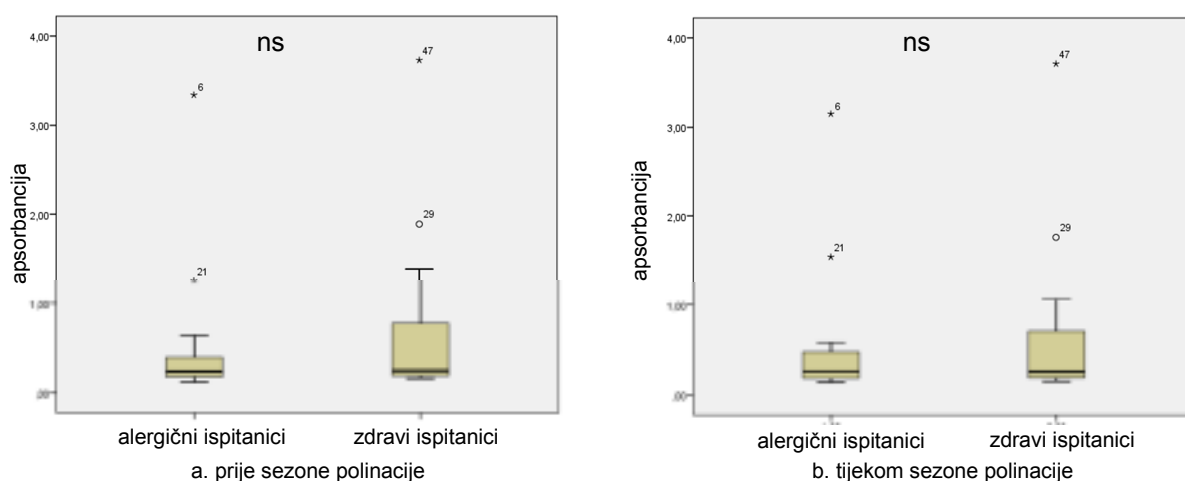
Slika 27. Usporedba razine alergena-specifičnog IgG₂ (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) između bolesnika s atopijom i ispitanika kontrolne skupine prije i tijekom sezone polinacije biljke *Ambrosia elatior*



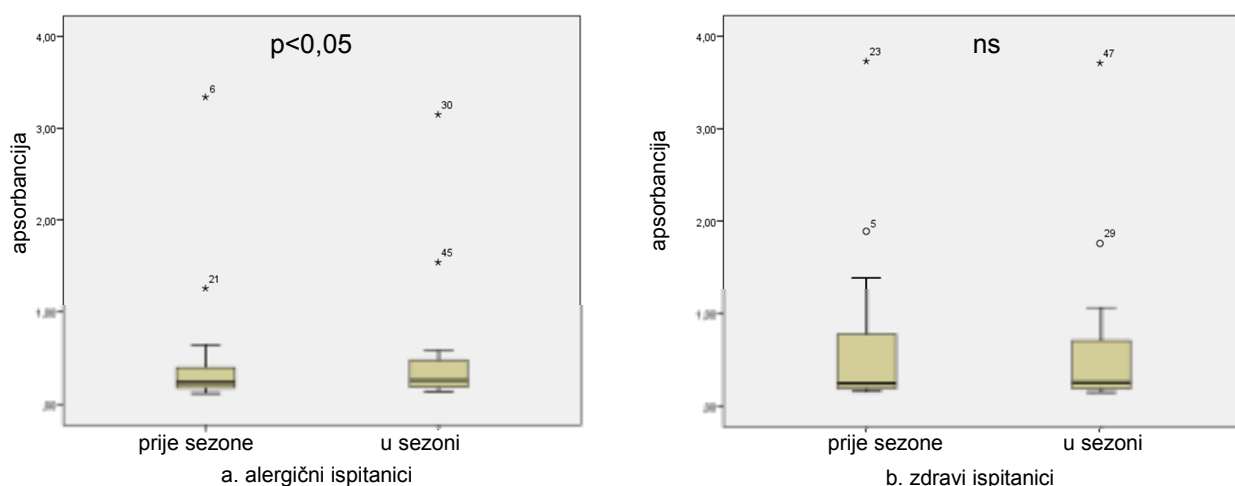
Slika 28. Usporedba razine alergena-specifičnog IgG₂ (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) u bolesnika s atopijom (u predsezoni i sezoni) i ispitanika kontrolne skupine (u predsezoni i sezoni polinacije biljke *Ambrosia elatior*)

5.6. Promjene alergjen- specifičnih IgG₃ (slgG₃)

Srednja vrijednost razine slgG₃ u bolesnika prije sezone polinacije iznosila je 0,44±0,66 i nije se značajno razlikovala od kontrole (0,60±0,80), a razlika nije nađena niti u sezoni polinacije (0,47±0,64 vs. 0,58±0,78, tablice 6 i 7, slika 29). Gledajući razinu slgG₃ unutar skupina, u sezoni polinacije je došlo do statistički značajnog porasta razine slgG₃ u bolesnika i statistički neznačajnoga sniženja slgG₃ u kontrolnih ispitanika.



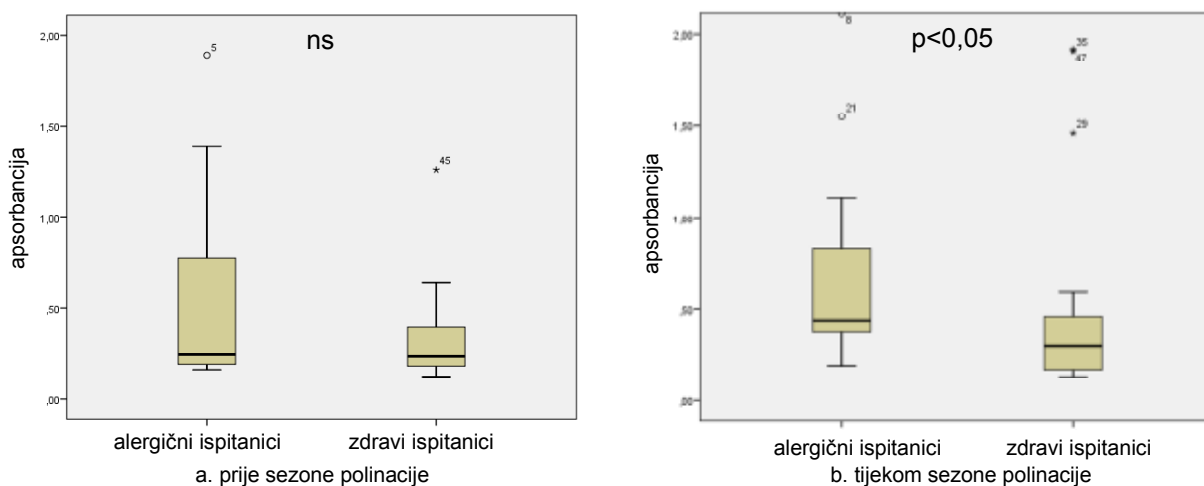
Slika 29. Usporedba razine alergjen-specifičnog IgG3 (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) između bolesnika s atopijom i ispitanika kontrolne skupine prije i tijekom sezone polinacije biljke *Ambrosia elatior*



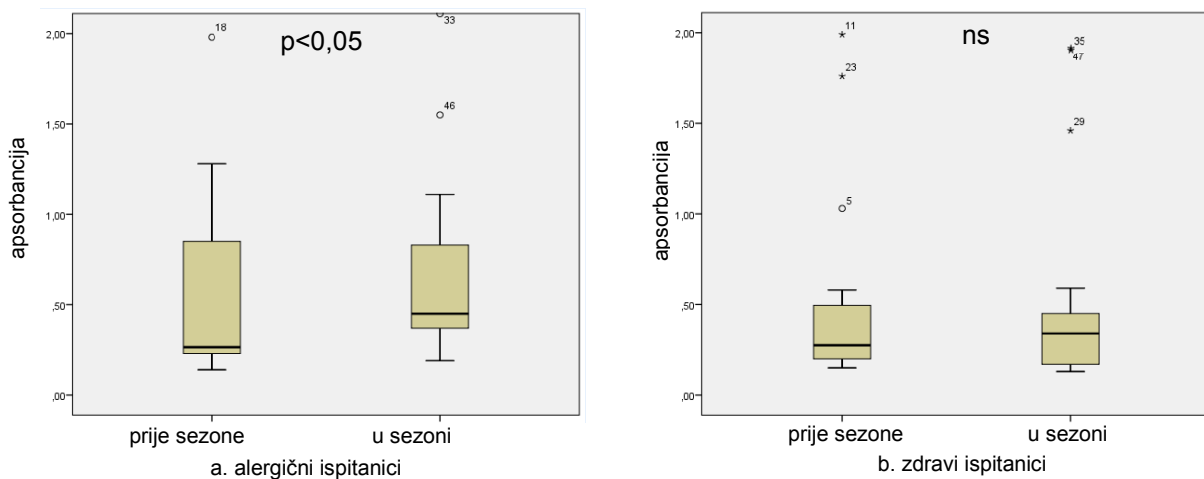
Slika 30. Usporedba razine alergjen-specifičnog IgG3 (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) u bolesnika s atopijom (u predsezoni i sezoni) i ispitanika kontrolne skupine (u predsezoni i sezoni polinacije biljke *Ambrosia elatior*)

5.7. Promjene alergen- specifičnih IgG₄ (slgG₄)

Srednja vrijednost razine slgG₄ u bolesnika prije sezone polinacije iznosila je $0,68 \pm 0,76$ prema $0,62 \pm 0,90$ u kontrolnoj skupini, ali razlika nije bila statistički značajna. U sezoni polinacije došlo je do statistički značajnog porasta razine slgG₄ u ispitivanoj skupini ($0,94 \pm 1,01$, tablice 6 i 7, slike 31 i 32).



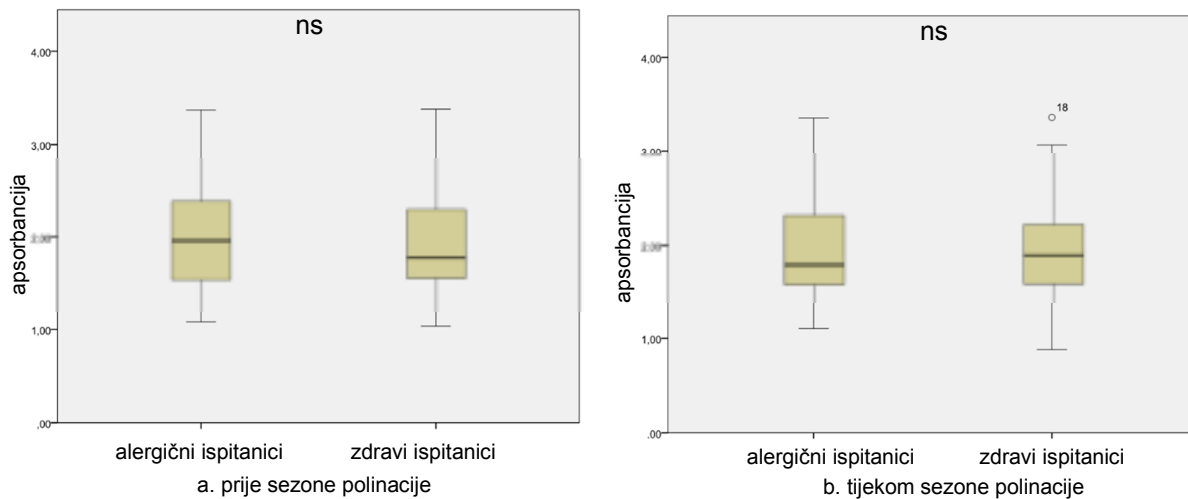
Slika 31. Usporedba razine alergen-specifičnog IgG₄ (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) između bolesnika s atopijom i ispitanika kontrolne skupine prije i tijekom sezone polinacije biljke *Ambrosia elatior*



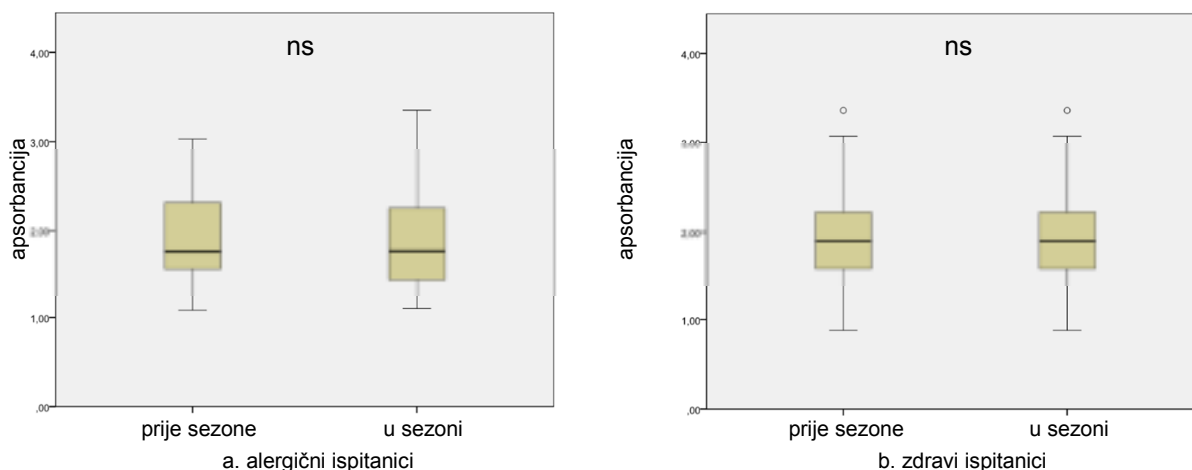
Slika 32. Usporedba razine alergen-specifičnog IgG₄ (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) u bolesnika s atopijom (u predsezoni i sezoni) i ispitanika kontrolne skupine (u predsezoni i sezoni polinacije biljke *Ambrosia elatior*).

5.8. Promjene alergen- specifičnih IgM (slgM)

Značajne razlike u razini slgM između skupina u vremenu prije sezone polinacije i u sezoni polinacije nisu nađene (tablice 6 i 7, slike 33 i 34).



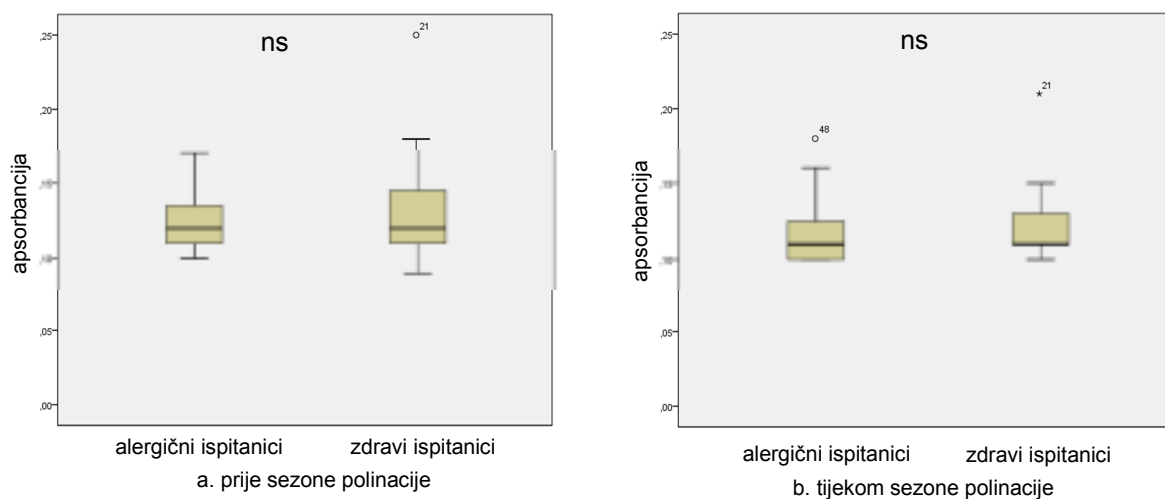
Slika 33. Usporedba razine alergen-specifičnog IgM (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) između bolesnika s atopijom i ispitanika kontrolne skupine prije i tijekom sezone polinacije biljke *Ambrosia elatior*.



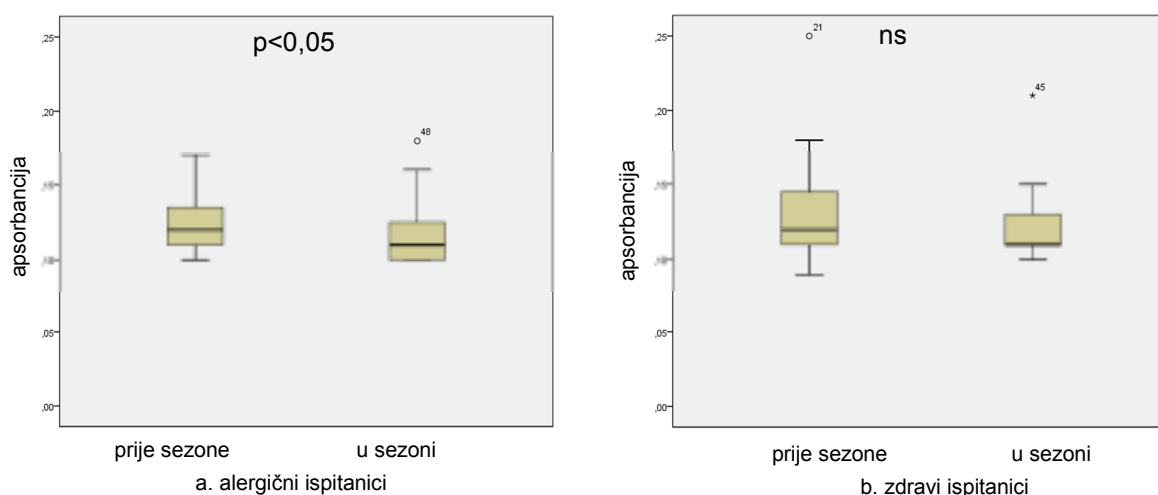
Slika 34. Usporedba razine alergen-specifičnog IgM (izraženo medijanom i rasponom apsorbancije) u bolesnika s atopijom (u predsezoni i sezoni) i ispitanika kontrolne skupine (u predsezoni i sezoni polinacije biljke *Ambrosia elatior*).

5.9. Promjene alergena- specifičnih IgD (slgD)

Srednja vrijednost razina slgD u bolesnika prije sezone polinacije iznosila je $0,12 \pm 0,02$ i nije se statistički značajno razlikovala od kontrole ($0,13 \pm 0,03$). Značajne razlike između skupina nisu nađene niti u sezoni polinacije, iako je tada u obje skupine opažen pad razine slgD, statistički značajan samo u skupini bolesnika (tablice 6 i 7, slike 35. i 36)



Slika 35. Usporedba razine alergena-specifičnog IgD (izraženo medijanom i rasponom apsorbanacije) između bolesnika s atopijom i ispitanika kontrolne skupine prije i tijekom sezone polinacije biljke *Ambrosia elatior*.



Slika 36. Usporedba razine alergena-specifičnog IgD (izraženo medijanom i rasponom apsorbanacije) u bolesnika s atopijom (u predsezoni i sezoni) i ispitanika kontrolne skupine (u predsezoni i sezoni polinacije biljke *Ambrosia elatior*).

Tablica 8. Sažeti prikaz dinamike specifičnih imunoglobulina u ispitivanim skupinama: statistički značajne promjene obilježene su sivom bojom

	A vs. Z (PS)	A vs. Z (US)	A (PS vs. US)	Z (PS vs. US)
slgE	A>>Z	A>>Z	porast	---
slgA1	---	A>Z	porast	---
slgA2	---	A>Z	---	---
slgG1	---	---	---	---
slgG2	---	A<Z	---	blagi pad
slgG3	---	---	blagi porast	---
slgG4	---	A>Z	porast	---
slgM	---	---	---	---
slgD	---	---	blagi pad	---

Legenda: A-bolesnici s alergijom, Z-zdravi ispitanici/kontrolna skupina, PS-prije sezone polinacije, US-u sezoni polinacije

6. Rasprava

Jedan od glavnih ciljeva ovoga rada bio je istražiti fiziološku reaktivnost humoralne imunosti čovjeka na ponavljanu izloženost alergenu iz okoliša, u ovom istraživanju peludi biljke *Ambrosia elatior*. Iako se može naći relativno velik broj radova o razini alergen-specifičnih izotipova imunoglobulina u krvi i sekretima bolesnika s alergijom, radova koji pokazuju fiziološku reakciju nealergičnih pojedinaca u literaturi je malo. Tek posljednjih godina bilježi se povećanje broja studija koje istražuju razine specifičnih imunoglobulina drugih izotipova, osim IgG (185, 200, 201), pri čemu se većina objavljenih radova bavila cjelogodišnjim alergenima i u jednoj vremenskoj točki.

Rezultati ovoga istraživanja su iznenađujući zbog više razloga. Pokazana je visoka razina alergen-specifičnih protutijela razreda M. Prisutnost sIgM pokazali su i drugi autori (177), ali ne u ovako visokim razinama. Razlog ovoj pojavi je možda u činjenici kako su u tim istraživanjima promatrani bolesnici alergični na pelud trava koja je ipak značajno manje agresivna od peludi biljke *Ambrosia elatior*.

Budući da se u ovom istraživanju radi o ispitanicima koji su ponavljano bili izloženi alergenu tijekom života, bilo je za očekivati prisutnost svih razreda imunoglobulina. Nekadašnja mišljenja kako u serumu zdravih ispitanika nema alergen-specifičnih Ig svih nealergijskih razreda nisu se pokazala točnima (130). Više autora je pokazalo povišene razine sIgA na sluznici zdravih ispitanika, što je navodilo na zaključak kako inducirani sIgA ima protektivnu ulogu i sprječava nastanak alergijske bolesti (185). Ujedno su praćene povišene vrijednosti IgG1 i IgG4 sa sličnim zaključkom (201). Prisutnost i dinamika ostalih podrazreda imunoglobulina nije bila sustavno zabilježena. Unatoč brojnim istraživanjima u atopičara (prvenstveno onih koji primaju specifičnu imunoterapiju) u dostupnoj literaturi ne nalazimo ciljanih istraživanja koja mjere dinamiku imunološkog odgovora zdravih ispitanika tijekom povećanja prirodne ekspozicije alergenu, a koje bi potvrdile mišljenje o fiziološkoj reakciji Th1-odgovora i produkciji nealergijskih imunoglobulina. Također se ne nalazi istraživanja koja bi pokazala kako je stvaranje „blokirajućih“ protutijela (IgG1 i IgG4) u zdravih ispitanika nakon izloženosti peludi zbilja fiziološki događaj (202). Iako postoje određene statistički značajne razlike u razinama pojedinih razreda imunoglobulina, donekle iznenađuje prisutnost specifičnih imunoglobulina i u svim ostalim podrazredima

imunoglobulina. Razlike se nalaze od razreda IgD, gdje su prisutna u minimalnoj detektabilnoj količini, pa do IgM, koja su prisutna u znatnoj količini.

Rezultati ovoga istraživanja sugeriraju prisutnost svih razreda alergen-specifičnih imunoglobulina u bolesnika s alergijom, dok su u zdravih ispitanika prisutne sve nealergijske razrede i podrazrede. Razlike u razinama imunoglobulina između ove dvije skupine ispitanika prije sezone polinacije, gotovo ne postoje. U bolesnika s alergijom nije nađen defekt humoralnog imunološkog sustava.

Za razliku od brojnih istraživanja koja su pokazale prisutnost specifičnih protutijela izotipova A, G i E u sekretima zdravih ispitanika, ima i studija koje to nisu dokazale, na primjer studija Bensona i suradnika (203). U ovoj studiji je pokazana ujednačena razina alergen-specifičnih imunoglobulina svih razreda (osim IgE) u serumu u zdravih ispitanika, a to su dijelom pokazali i drugi istraživači (201). Neistražena je i fiziološka dinamika lučenja ostalih izotipova imunoglobulina, prvenstveno IgA1, IgA2, IgM, i IgD. Poznato je, međutim, kako se kratko nakon izlaganja alergenu u serumu pojavljuju aktivirani (CD154+) limfociti T i Th1 (IL-2+) i Th2 (IL-4+) limfociti (204), stoga se moglo očekivati povećanje proizvodnje specifičnih imunoglobulina.

U ovom istraživanju bilo je očekivano da nakon unosa stranih proteina (u ovome slučaju aeroalergena biljke *Ambrosia elatior*) imunološki sustav zdravih ispitanika reagira fiziološkim Th1-odgovorom i povećanom produkcijom imunoglobulina, prvenstveno razreda IgG s ciljem otklanjanja ovih proteina, što je pokazano u animalnim modelima. Međutim, iznenađujuća je odsutnost dinamike razine alergen-specifičnih imunoglobulina u zdravih ispitanika. Oni gotovo niti ne pokazuju znakove aktivacije Th1-imunološkog odgovora. Jedino statistički značajno zbivanje na izloženost peludi u sezoni polinacije je blagi pad razina IgG2, što nagovještuje moguću fiziološku ulogu ovog razreda imunoglobulina u otklanjanju alergena iz cirkulacije i tkiva u zdravih ispitanika. Budući da IgG2 ne sudjeluju u opsonizaciji, slabo se vežu za FcR na fagocitnim stanicama i slabo aktivira komplement, taj izotip u kompeticiji s IgG1 bi mogao doprinosti smirivanju upalne reakcije. Prisutan je i blagi porast sIgG4 (koji međutim nije statistički značajan) što tek donekle potvrđuje rezultate drugih autora (201, 205). Čini se kako imunološki sustav zdravih ispitanika na sezonske alergene ne reagira povećanjem sinteze Th1 smjera nakon prirodne izloženosti peludi tijekom sezone polinacije.

U ovom istraživanju otkriveni su alergen-specifični izotipovi svih razreda imunoglobulina, makar i u vrlo niskim razinama. Rezultati su pokazali alergen-specifični odgovor za gotovo sve razrede imunoglobulina u bolesnika s alergijom, što su pokazale mnoge ovdje nabrojene studije. Iako je učestalost alergijskih bolesti u bolesnika s IgA imunodeficijencijom visoka i prisutna je u oko polovice bolesnika (206), učestalost imunodeficijencija u bolesnika s alergijskim bolestima je mala i iznosi manje od 1% (207, 208). U ovom istraživanju selektivna imunodeficijencija nije dokazana.

Za razliku od zdravih ispitanika, u bolesnika s alergijom nakon prirodne stimulacije alergenom dolazi do porasta mnogih razreda imunoglobulina, što pokazuje da je imunološki odgovor na alergen kompleksan i uključuje više izotipova. I taj događaj upućuje na mogućnost kompromitacije epitelne barijere u bolesnika s alergijom. Za razliku od bolesnika s alergijom, zdravi ispitanici u sezoni nisu reagirali porastom niti jednog razreda imunoglobulina. Razlozi za to mogu biti višestruki:

- nepropusnost epitelne barijere - ljudski organizam prema vanjskom svijetu ima nepropusnu zapreku koju čine koža i sluznice. U nekim alergijskim entitetima, kao npr. u astmi dokazana je povećana propusnost epitelne barijere (209, 210). Koliko je ta barijera propusna za alergene u atopičara i zdravih ispitanika te ima li uopće između njih razlike, za sada nije poznato (211). Ukoliko je u bolesnika s alergijom osnovni patofiziološki mehanizam propusnost barijere, nameće se pitanje zbog čega su neki bolesnici s alergijskom monosenzibilizirani, a drugi polisenzibilizirani;
- različitosti u kaveolarnom transportu alergenskih molekula (46);
- različitosti u transcitozi alergenskih molekula (212);
- indukcija imunotolerancije indukcijom IL-10+ limfocita T, a u novije vrijeme i IL-10+ regulacijskih limfocita B (49);
- učinkovitije lokalno stvaranje neutralizacijskih slgA i slgG u sluznici zdravih osoba (213).

Možemo spekulirati kako je uzrok nepromijenjenoj razini alergen-specifičnih slg u zdravih ispitanika intaktna i/ili kompetentna epitelna barijera, čemu u prilog govore i

opažanja Mattile i suradnika (21). Za razliku od radova kojima se dokazuje prisutnost slg u cirkulaciji, u dostupnoj znanstvenoj i stručnoj literaturi ne nalazimo niti jedan primjer mjerenja količine alergena u cirkulaciji bilo zdravih ispitanika ili ispitanika s atopijom, a što bi bilo od velike koristi u pronalaženju mjesta primarnog poremećaja.

Čak i u zdravih ispitanika nađene su niske razine alergen-specifičnih slgE, što se poklapa s rezultatima drugih autora (214). Njihova funkcija nije poznata, ali svakako upućuje i na aktivnost te grane imunološkog odgovora. Iako se ranije smatralo da se IgE pojavljuje tek u kasnoj fazi odgovora na antigen, novija istraživanja na miševima s genetski modificiranim IgE repertoarom pokazuju da se većina IgE u serumu proizvodi u kratkoživućim IgE+ plazma-stanicama, a da manji dio IgE nastaje u dugoživućim, memorijskim IgE+ plazma-stanicama (215). Novija istraživanja na miševima su pokazala kako su limfociti B koji sintetiziraju IgE jedni od prvih koje napuštaju germinalne centre sekundarnih limfnih tkiva nakon antigenske stimulacije (216). Tako stvorena IgE protutijela su niskog afiniteta. Za nastanak IgE protutijela visokog afiniteta nužno je prethodno odvijanje izotipskog prekapčanja s IgM preko IgG na IgE (217), a čini se kako nastaju neposredno nakon prekapčanja u IgG4 (108) i to pod utjecajem Th-2 citokina.

U istraživanjima koja su analizirala sezonske alergene u jednoj vremenskoj točki, nađeno je da se humoralni odgovor zdravih ljudi na alergene sastoji uglavnom od slgG1 i IgG4 te sekrecijskih IgA (183, 184, 185, 200, 218). U svom članku Ciprandi 2010. godine navodi kako niti sam ne nalazi studija koje pokazuju dinamiku slg u zdravih ispitanika (218). U studijama koje su istraživale cjelogodišnje alergene promatrani su IgE, IgG1, IgG4, IgA molekule (182, 184, 218). Nalaze se i izolirani dokazi prisutnosti alergen-specifičnih protutijela IgM, dok se dinamike ostalih razreda i podrazreda protutijela u dostupnoj literaturi ne nalazi.

Za razliku od ovoga, dinamika slg analizirana je brojnim studijama bolesnika koji su liječeni specifičnom imunoterapijom (SIT). Tijekom imunoterapije dolazi do porasta slgG1 i slgG4, dok se razine slgE nisu značajnije mijenjale (219). Afinitet slgG4 u tih bolesnika je viši i pokazuje kompetitivno jače vezanje od slgE, čak za 40%, dok je specifičnost slgM i IgA bila manja u odnosu na specifičnost IgE u ispitanika s alergijom (200). Ta pojava ide u prilog tzv. "temporalnom modelu" koji su predložili Collins i suradnici (220), a prema kojem IgA i IgM nastaju u ranijoj fazi upale, a slgG4 u zadnjoj fazi upalne reakcije s ciljem postupnog stišavanja upalne reakcije. Analizom

somatskih mutacija stanovnika područja s visokom učestalosti parazitarnih infekcija utvrđeno je kako se broj mutacija povećava, počevši od IgG3, zatim IgG1, IgG2 i najviše kod IgG4. Točno takav je i poredak gena koji kodiraju njihove konstantne regije u genomu (220).

Neki autori uspoređivali su specifičnost protutijela raznih izotopova u odnosu na sIgE kod bolesnika na sublingvalnoj hiposenzibilizaciji s Der p (221, 222). Pri tome su zaključili kako su IgG su pokazivali veću specifičnost, dok su IgM i IgA protutijela bila manje specifična. Siman i sur. su dokazali veći afinitet protutijela IgG1 i IgG4 nego IgE u *in vitro* modelu (200). Neki autori pokazali su u *in vitro* modelu korelaciju razina sIgE i sIgG1, te sIgE i sIgG4 u bolesnika osjetljivih na alergene *Dermatophagoides pteronyssinus*, u jednoj vremenskoj točki (185).

6.1. Izrazito visoki specifični IgM

Unatoč velikoj količini sIgM u cirkulaciji, u ovom istraživanju nije detektirana statistički značajna razlika u razinama sIgM između alergičnih i zdravih ispitanika, kao niti promjene razine IgM tijekom prirodne izloženosti peludi biljke *Ambrosia elatior* u obje skupine ispitanika. Navedeno se podudara s istraživanjem Niederberger za alergene Phl. P i Bet v. u kojem je također detektiran sIgM, ali bez razlike između zdravih ispitanika i bolesnika s alergijom, kako prije tako i tijekom sezonske ekspozicije (177). Iako su molekule IgM prvoga (primarnoga) odgovora na strane molekule, u fazi ponovne izloženosti alergenu biljke *Ambrosia elatior* ne dolazi do porasta razine IgM u zdravih ispitanika niti u bolesnika. Ova činjenica može se obrazložiti spoznajama da se alergijsko zbivanje događa na periferiji te da protutijela IgM po svojoj prirodi niskog afiniteta nemaju značajniju ulogu u već uspostavljenom humoralnom odgovoru ostalih razreda na alergen.

Još tijekom pripremnih mjerenja ovog istraživanja, iznenadile su visoke vrijednosti sIgM u obje skupine ispitanika. Dobivene vrijednosti apsorbancije bile su oko 1000 puta više od vrijednosti dobivenih mjerenjem ostalih razreda specifičnih imunoglobulina. Budući da je IgM, uz IgD, prvi razred imunoglobulina koji se luči u organizmu, a stvaraju ih nezreli limfociti B, kao i da se IgM zbog svoje pentamerne forme nalaze uglavnom intravaskularno, ipak nije bilo neopravdano očekivati prisutnost specifičnog IgM u serumu naših ispitanika. Tome doprinosi i pentamerni

oblik molekule IgM sa znatno većim brojem veznih mjesta. Molekule IgM su svojevrsna "prirodna protutijela" i unaprijed sposobna vezati nove antigene iz okoliša, pa tako i antigene biljke *Ambrosia elatior*. Upravo zbog toga je bilo za očekivati visoke vrijednosti apsorbancije sIgM, kako u zdravih, tako i bolesnih ispitanika, mada niskog afiniteta. U većini slučajeva alergijska bolest se odvija na periferiji, a ne u cirkulaciji. Budući da IgM molekule uglavnom ne prolaze sluzničnu barijeru, njihova uloga u sprječavanju alergijske upale je time ograničena.

Za očekivati je, međutim, kako će ta protutijela adekvatno neutralizirati apsorbirani pelud i spriječiti sistemske reakcije. Međutim, obje skupine ispitanika pokazuju gotovo jednake vrijednosti sIgM u predsezoni i sezoni polinacije, pa je vrlo vjerojatno kako do neutralizacije alergena i potrošnje ovog razreda specifičnih protutijela tijekom sezone polinacije ne dolazi.

Baron-Bodo i suradnici promatrali su promjene razina sIg raznih razreda (uključujući i sIgM) u bolesnika preosjetljivih na pelud trava tijekom primjene sublingvalne imunoterapije, ali nisu izvršili mjerenja na uzrocima zdravih ispitanika (222). Njihovi rezultati nisu pokazali promjene razina IgM u skupini koja je primala sublingvalnu imunoterapiju u odnosu na bolesnika koji nisu bili podvrgnuti imunoterapiji. Zanimljivo je da nisu uočili promjene u razinama sIg iz uzoraka sline i nosnih ispiraka bolesnika, čak niti u skupini bolesnika koja je pokazala značajno kliničko poboljšanje.

Čak niti nakon supkutane primjene alergenskog preparata za hiposenzibilizaciju nije došlo do značajnih razlika u razinama sIgM (223). Čak da je i takva pojava dokazana, zbog parenteralne prirode unosa alergene u organizam ne bi bilo moguće izvoditi usporedbe s ovim istraživanjem. Iako to nije bio primarni cilj istraživanja, neki autori su određivali sIgM nakon *in vitro* stimulacije limfocita B pri čemu nije došlo do porasta sIgM (224).

Nejasno je kakvu ulogu imaju relativno visoke razine alergen-specifičnih IgM protutijela u serumu zdravih ispitanika i atopičara te zbog čega ne pokazuju blokirajuću aktivnost. U ovom istraživanju nijedan bolesnik nije imao sistemske manifestacije alergijskih bolesti posredovanih IgE protutijelima (urtikariju ili anafilaksiju), možda upravo zbog ovih protutijela. Bilo bi zanimljivo istražiti različitosti razina sIgM protutijela u bolesnika s anafilaksijom. Ukoliko se i nalaze u značajnijoj količini, razlog zbog kojeg ove velike količine specifičnog IgM ne sprječavaju sistemske reakcije bi onda valja tražiti u niskom afinitetu IgM razreda protutijela

prema stranim proteinima, a time i alergenima. Njihov afinitet je zapravo najmanji od svih razreda protutijela. Razredi imunoglobulina koji nastaju u kasnijoj fazi upalnog odgovora redovito pokazuju veću specifičnost od IgM, jer su prošle proces somatske hipermutacije i pozitivne selekcije. Kompetitivno se vežu za alergen čime IgM-klonovi primaju sve manje signala za proliferaciju.

U preliminarnim pokusima je prilikom određivanja optimalnoga razrjeđenja seruma ispitanika primijećeno kako velike količine IgM nisu ometale određivanje ostalih razreda imunoglobulina. Navedeno također govori u prilog da je afinitet IgM molekula značajno manji od afiniteta ostalih razreda imunoglobulina, a što su drugim metodama pokazale dosadašnje studije (219, 226).

Za razliku od ispitanika preosjetljivih na sezonske alergene, u djece s alergijskom astmom preosjetljivih na *Dermatophagoides pteronyssinus*, nađena su specifična IgM protutijela na kućnu prašinsku grinju (lat. *Dermatophagoides pteronyssinus*) u značajno višoj razini nego u zdrave djece (227), a dokazan je i *in vitro* porast specifičnih IgM protutijela na meričku grinju (lat. *Dermatophagoides farinae*) tonzilarnih limfocita nakon provokacije s alergenom.

6.2. Promjene specifičnih IgA1

Protutijela IgA1 se uglavnom nalaze na sluznici i znatno ih manje ima u intravaskularnom prostoru, stoga su promjene razina u ovoj studiji manje vidljive, ali ipak prisutne. U periodu prije prirodne ekspozicije alergenu nije nađena statistički značajna razlika između bolesnika s alergijom i zdravih ispitanika. Tijekom ekspozicije alergenu došlo je do značajnog porasta IgA1 u serumu bolesnika s alergijom te su ona više razine u odnosu na zdrave ispitanike. U skupini zdravih ispitanika ta razlika nije opažena. Budući da je podražaj za lučenje IgA uglavnom rezultat odvijanja reakcija na sluznici, gdje dolazi do susreta alergena i protutijela, opravdano je očekivati porast razine serumskog IgA kao odraz povećane proizvodnje i transporta IgA na sluznicu, tim više što je IgA1 prisutniji u serumu od IgA2. S obzirom kako u ovom istraživanju zdravi ispitanici nisu pokazali porast IgA u sezoni izloženosti peludi, mogući mehanizam i ovdje bi, osim imunotolerancije na alergen i kompetenije sluznične barijere u zdravih ispitanika, mogao bi imati i utjecaj dio IgM (ili drugih nealergijskih razreda Ig) u tkivu sluznice koji potencijalno neutralizira alergene, čime bi sustav bio u ravnoteži.

U literaturi se mogu naći radovi koji mjere dinamiku razina ukupnih sIgA, npr. rad Keenove i suradnika (178), međutim radova koji promatraju dinamiku sIgA1 tijekom sezonske izloženosti alergenu u literaturi se ne nalazi. Neki autori su mjerili razine sIgA1 u ispitanika preosjetljivih na alergen Der p i zdravih ispitanika, u jednoj vremenskoj točki, pri čemu nisu našli razlike (228).

Rezultati istraživanja razina i dinamike alergen specifičnih, ukupnih IgA u literaturi su nekonzistentni. Dok neki autori nalaze povećane razine ukupnog sIgA u serumu i sekretima ispitanika s alergijom (229, 230), drugi ih nalaze čak sniženima u odnosu na zdrave ispitanike (116, 185), koji ih čak smatraju „zaštitnima“.

Studije u kojima se mjerila dinamika sIgA1, uglavnom nalazimo u okviru primjene imunoterapije. I te studije su također dobile dvojbene rezultate: neki autori su primijetili porast razina sIgA1 u bolesnika na supkutanoj imunoterapiji (231), a neki ne (232, 233). Ove razlike se mogu pokušati duljinom primjene imunoterapije jer su istraživanja u kojima nisu nađene razlike uglavnom trajale kraće.

6.3. Promjene specifičnih IgA2

Statistički značajne razlike razina sIgA2 u vremenu prije sezone polinacije nisu zabilježene u ovoj studiji. Nije nađena niti statistički značajna razlika u razinama sIgA2 u vremenu prije sezone polinacije. Tijekom sezone polinacije razine sIgA2 su više u skupini bolesnika s alergijom, a ta razlika je statistički značajna.

U literaturi, nažalost, nema podataka o dinamici IgA2 iz slično dizajniranih istraživanja, izuzev rada Keenove i suradnika u kojoj su mjerene razine ukupnog sIgA (bez podrazreda) i u kojoj nije zabilježena statistički značajna razlika (178). U studijama su uglavnom promatrane razine ukupnih IgA, što je, s obzirom na veću zastupljenost IgA1 u serumu navedeno u ranijem poglavlju. Neki autori su mjerili razine sIgA2 u ispitanika preosjetljivih na alergen Der p i zdravih ispitanika, u jednoj vremenskoj točki, pri čemu je nađena viša razina sIgA2 u zdravih ispitanika (228).

Izvešća koja uspoređuju razine sIgA2 u bolesnika s alergijom prije i nakon primjene raznih vrsta imunoterapije su relativno brojna (230). Većina je autora suglasna kako imunoterapije dolazi do porasta sIgA2 (231, 232, 233). Proporcionalno trajanju studije povećavao se i porast razina sIgA2. Pilette i suradnici (233) tako navode i do osam puta veće razine sIgA2 u bolesnika s alergijom nakon specifične imunoterapije (SLIT).

I u ovom slučaju, ne nalazimo dinamike razina sIgA2 u zdravih ispitanika, što također navodi na zaključak kako aktivacije Th1 odgovora nema. I ova pojava navodi, osim indukcije tolerancije, na pitanje imunokompetentnosti sluznične barijere.

6.4. Promjene specifičnih IgG1

U ovom su radu nađene jednake razine IgG1 u obje ispitivane skupine i u obje vremenske točke. Prisutnost specifičnih slgG1 u serumu ljudi su dokazali brojni autori, kao npr. Ventura i suradnici u ispitanika preosjetljivih na nematodu *Anisakis simplex* (179), u kojoj nisu bili promatrani zdravi ispitanici. Za razliku od njih, neke studije, kao npr. istraživanje Siman i sur. su promatrali razine cjelogodišnjeg alergena *Dermatophagoides pteronyssinus* u alergičnih, ali i zdravih ispitanika (200). U toj studiji su izmjerene razine slgG1 bile više u bolesnika s atopijom od onih zdravih ispitanika, što u ovoj studiji nije pokazano. Jedan od objašnjenja te pojave bi moglo biti u tome što je u ovoj studiji istraživani sezonski alergen, a u studiji Simanove i suradnika cjelogodišnji alergen.

Interes za određivanje slgG u serumu zdravih ispitanika potječe još iz 1973. godine, u radu Yungingera i suradnika gdje su slgG detektirani u niskim količinama i bez dinamike nakon prirodne ekspozicije alergenu (170). Posljednjih godina povećan je interes za određivanje slgG1 u serumu bolesnika koji primaju imunoterapiju. Autori koji su promatrali dinamiku slgG1 protutijela tijekom primjene sublingvalne i supkutane terapije zabilježili su porast slgG1 (219, 231, 235, 236), a sličan rezultat su pokazali Park i suradnici tijekom primjene supkutane imunoterapije (237). Ova vrsta protutijela imala je veći afinitet prema alergenu od slgE (200).

Studije su zabilježile indukciju IgG1 u bolesnika koji su primali imunoterapiju, zbog čega neki autori i ovom podrazredu protutijela također pripisuju „blokirajuća“ svojstva. Iako su brojni autori suglasni kako razina slgG1 u bolesnika koji primaju imunoterapiju raste (177, 179, 180), u ovoj studiji tijekom polinacije nije došlo do statistički značajnog porasta razina slgG1 niti kod zdravih, niti alergičnih ispitanika. Više autora navodi opažanje korelacije kliničkih učinaka imunoterapije i omjera slgG4/slgG1 protutijela kao markera uspješnosti imunoterapije (235). Budući da tijekom prirodne ekspozicije peludi ne dolazi do značajnijeg porasta slgG1, a dolazi do porasta slgG4 (197) tako će i ovaj omjer kod prirodne ekspozicije peludi biti povišen, što ne treba navesti na zaključak kako je omjer slgG4/slgG1 pokazatelj učinka imunoterapije. Studija koje bi istraživale dinamiku slgG1 u zdravih ispitanika tijekom prirodne ekspozicije peludi biljke *Ambrosia elatior* ne nalazim u dostupnoj literaturi.

6.5. Promjene specifičnih IgG2.

U ovom istraživanju nije nađena razlika u razini sIgG2 između zdravih ispitanika i bolesnika s atopijom što se podudara s rezultatima drugih autora: Mori za alergen Blo t (107), Nahm za alergen Der f (238) i Niederberger za alergene Bet v 1 i Phl p te Codine i sur. za alergene soje (188).

Tijekom prirodne ekspozicije alergenu u ovoj studiji je prisutan statistički značajan pad razine IgG2 u skupini zdravih ispitanika. To može ukazivati da je ovaj razred imunoglobulina važan u neutralizaciji cirkulirajućeg antigena, iako količina i dinamika pojave inhalacijskih alergena u cirkulaciji nikada nije pokazana (239). Budući da IgG2 ne aktivira komplement, a pokazuju jači afinitet za alergen od drugih imunoglobulina razreda G, to bi moglo značiti kako bi IgG2 mogao neutralizirati alergen bez dodatnog poticanja imunološkog odgovora i upale. Nije, međutim, jasno zbog čega zaštitni učinak ovog podrazreda imunoglobulina, iako važan u kontroli sinobronhalnih infekcija, nije očevidan u bolesnika s alergijom. Statistički značajna razlika u ovom slučaju nije nađena niti u studiji Niederberger (177). Tijekom imunoterapije dolazi do porasta razine sIgG2 u bolesnika s alergijom, što je potvrđeno u više studija (235, 236), ali ne u svima (219). Studija koje bi istraživale dinamiku sIgG2 u zdravih ispitanika tijekom prirodne ekspozicije peludi biljke *Ambrosia elatior* ne nalazim u dostupnoj literaturi.

6.6. Promjene specifičnih IgG3

U ovom istraživanju nađen je statistički značajan porast slgG3 u bolesnika s alergijom tijekom prirodne ekspozicije alergenu peludi biljke *Ambrosia elatior*. Prema tzv. "temporalnom modelu" Collinsa i suradnika (220), ovaj podrazred imunoglobulina predstavlja prvo protutijelo čija razina raste nakon izlaganja alergenu, koje aktivacijom komplementa i vezanjem za Fc γ -receptore aktiviraju upalne stanice ranog imunološkog odgovora i doprinose stvaranju kliničke slike alergijske bolesti. U zdravih ispitanika ne dolazi do ovakvog porasta. Do sličnih rezultata vezanja IgG3 za Fc γ RII-receptore na eozinofilima, njihove posljedične degranulacije i uloge u etiologiji alergijske bolesti došli su Kaneko i suradnici (240). Codina i sur. nalaze slgG3 na alergene soje u malom udjelu zdravih ispitanika, a ne nalaze ih kod alergičnih ispitanika (188).

Tijekom primjene imunoterapije alergenima čempresa neki autori nisu zabilježili porast slgG3 (219), dok je grupa indijskih autora zabilježila porast IgG3 tijekom izloženosti alergenu kaparovke *Gynandropsis gynandra* hiposenzibilizacijom (236).

6.7. Promjene specifičnih IgG4 i "blokirajuća protutijela"

Razine sIgG4 između ispitivane i kontrolne skupine prije ekspozicije alergenu su podjednake. Rezultati se podudaraju s rezultatima drugih autora, npr. studije Siman i suradnika u kojima su razine sIgG4 u bolesnika osjetljivih na alergene *Dermatophagoides pteronyssinus* i zdravih ispitanika bile podjednake (200). Zanimljivo je da je ista grupa autora u ranijim studijama izvještavala drugačije rezultat, tj. više razine sIgG4 u osoba s alergijom (185). Slično su izvijestili Pereira i sur. (201), a razlike s dobi bolesnika su bile još i veće (241).

U vrijeme prirodne ekspozicije alergenu razina sIgG4 u bolesnika s alergijom značajno raste (197). Aalberse navodi kako ispitanici neatopijske konstitucije kojima su dugotrajnom primjenom antigena inducirana protutijela IgE ipak ne pokazuju alergijske simptome, što pripisuje visokoj razini „blokirajućih“ IgG4 protutijela (175). U pčelara koji nisu razvili alergiju razine sIgG4 su 1000 puta više od sIgE (242). Ova pojava nije usporediva s ovom studijom, budući da kod uboda pčele antigeni zaobilaze epitelnu barijeru i odlažu se supkutanim pristupom u potkožno tkivo.

Brojni autori pratili su dinamiku specifičnih IgG4 protutijela u serumu bolesnika tijekom imunoterapije. Imunoterapijom se drugačijom rutom primjene alergena zaobilaze aktivirani dijelovi imunološkog sustava na koži i sluznicama. Učinci takve primjene očituju se u smanjenju alergijske upale (243). Supkutana imunoterapija (SCIT), pa čak i sublingvalna imunoterapija (SLIT) mijenjaju tijek alergijske bolesti i dovode do raznih promjena u imunološkom sustavu od kojih su najznačajnije poticanje imunotolerancije indukcijom proizvodnje IL-10 i TGF- β , Treg FOXP3+ limfocita i diferencijacijom limfocita T u Th1-smjer, ali i promjenama razine IgG4, IgE i IgA (244, 245, 218). Navedene promjene se ne vide samo na mjestu primjene alergena, već i na periferiji. I druge vrste imunoloških stanica tome doprinose povećanom sintezom IL-10, uključujući dendritičke stanice, NKT-stanice i NK-stanice. Čini se da SLIT potiče pDC tonzila na diferencijaciju, kao i CD4+CD25+CD127-FOXP3+ Treg stanice (246). Iako u početnoj fazi imunoterapije dolazi do povećanog stvaranja IL-4, tj. omjera IL-4/IFN- γ i specifičnog IgE, tijekom faze održavanja oni se smanjuju (247, 248). Tijekom SLIT-a ne dolazi do sniženja specifičnoga IgE (248, 249).

Konzistentno je primijećen kontinuirani porast slgG4 tijekom imunoterapije, proporcionalan s dozom primijenjenog alergena (205). Budući da su ispitivanja u osoba s alergijom uspoređivala razine slgG4 prije i nakon hiposenzibilizacije (ponajprije radovima Aalberse i suradnika), u kojima je zabilježen višestruki porast razina IgG4 u bolesnika na hiposenzibilizaciji, to je doprinijelo formiranju teorije o "blokirajućim protutijelima" (128, 205). Aalberse je vjerojatno bio inspiriran radovima svog prethodnika van der Giessen, pa i Yungingera, u kojima se nalaze još raniji pokušaji određivanja podrazreda IgG u bolesnika na imunoterapiji (170, 250). Međutim, kasnijim istraživanjima nije nađena korelacija između porasta slgG4 u bolesnika na imunoterapiji i kliničkog poboljšanja (235). Tome u prilog govore i druge spoznaje, npr. činjenica da je u nekim slučajevima kliničko poboljšanje nastupilo i prije porasta IgG4 (252, 253), pa čak i u bolesnika bez porasta IgG4 (222). Slično su pokazali i drugi autori, zaključujući da je porast slgG4 samo surogatni marker za IL-10 i Treg aktivnosti (254). Jarvis i sur. su izvijestili o povezanosti IgG4 sa simptomima u odraslih, ali ova analiza nije uzimala u obzir i zdrave ispitanike. Iz jasnih etičkih razloga nisu provedene studije primjene hiposenzibilizacije na zdravim ispitanicima, gdje bi se vjerojatno primijetio sličan trend (255). Porast slgG4 bio je proporcionalan ukupnoj primijenoj količini alergena. Bilježi se i porast ukupnoga IgE, ali proporcionalno manji nego IgG4. Afinitet slgG4 molekula u takvih bolesnika je viši i pokazuje kompetitivno jače vezanje od slgE, čak za 40-ak %, dok je specifičnost slgM i IgA bila manja u odnosu na specifičnost IgE u ispitanika s alergijom (200). Ta pojava ide u prilog tzv. "temporalnom modelu" kojeg su predložili Collins i suradnici, a prema kojem IgA i IgM nastaju u ranijoj fazi upale, a slgG4 u zadnjoj fazi upalne reakcije s ciljem postupnog stišavanja imunoreaktivnosti (220). Neke autore je porast razina slgG1 kao i nepromijenjena razina slgG1 tijekom izloženosti alergenu, kao što je to slučaj tijekom hiposenzibilizacije, navela na zaključak kako omjer slgG4/slgG1 može poslužiti kao biljeg uspješnosti imunoterapije (223, 235). Uspoređujući te rezultate s rezultatima ovoga istraživanja dolazi se do zaključka da je porast slgG4, a time i omjera slgG4/slgG1 samo popratna pojava reakcije imunološkog sustava na povećanu izloženost alergenu. Treba, ipak, napomenuti da se glavna imunološka reakcija odvija u sluznici pa su razine ciljnih imunoglobulina (IgG4, IgA1, IgA2, IgE) u serumu niske, a na periferiji (tkivima) visoke. Određivanje imunoglobulina i citokina u bioptatima sluznice i ispicima nosa dalo je znatno bolje rezultate: porast omjera Th1/Th2 na račun porasta Th1 citokina, prvenstveno IL-2, INF- γ i IL-12) (205), kao

porast IgG1 i IgA1 i IgA2 tijekom imunoterapije (251, 230, 233, 236). Budući da i tu nema studija kretanja alergen-specifičnog odgovora u zdravih, autori su izveli zaključak kako je porast tih podrazreda imunoglobulina jedan od mogućih mehanizama kliničkog poboljšanja.

Važno je istaknuti činjenicu koja se spominje u vrlo malom broju radova, a to je da nakon primjene SIT pripravkom za hiposenzibilizaciju koji je sadržavao ekstrakte peludi više trava, nije zabilježena *de novo* pojava slgE u osoba koje ranije nisu bile alergične na neke sastojke alergenskog pripravka (222).

Rezultati ovoga istraživanja pokazuju kako i prirodna ekspozicija alergenu iz okoliša, kao i primjena hiposenzibilizacije imaju sličan učinak na dinamiku slgG4, a to je porast serumske razine. On je posljedica prolongirane stimulacije alergenom i fiziološki odgovor humoralnog imunološkog sustava, što su potvrdili i drugi istraživači (247). Ovime se teorija poboljšanja alergijskih bolesti zbog nastanka „blokirajućih protutijela“ čini manje vjerojatnom (197).

6.8. Promjene specifičnih IgD

U ovom istraživanju nije nađena razlika u razinama sIgD između promatranih skupina prije sezone polinacije. Međutim, tijekom prirodne ekspozicije dolazi do statistički značajnog pada razine IgD u ispitanika s alergijom, što svakako upućuje na određenu ulogu ovog podrazreda protutijela u interakciji s antigenom. Budući da se velika količina IgD nalazi duž epitelne strane bazalne membrane respiracijske sluznice (135), ovaj pad može ukazivati na ulogu sIgD u neutralizaciji antigena. Budući da efektorske funkcije IgD nisu do kraja jasne ili nisu klinički značajne, tako ni važnost dinamike sIgD u sezoni polinacije nije jasna. Neki autori su mišljenja da porast ukupnih IgD ima ulogu u normalizaciji astmatskog odgovora u djece u prvim mjesecima života (172). Međutim, u toj studiji su promatrane razine ukupnih IgD, ali ne i sIgD.

Posljednjih godina opaža se porast interesa istraživača za funkciju sIgD. Postoje opažanja indukcije IgD sekrecijskih limfocita B tijekom rane izloženosti alergenima hrane. Aktivacija takvih IgD molekula vezanih na površini bazofila dovode do otpuštanja IL-4, IL-5 i IL-13 i pojave Th2 limfocita (256). Primjena Anti-IgD dovodi do sniženja udjela zrelih CD19+IgD+ limfocita B, ali i povišenja proizvodnje IgE protutijela (257).

Ovdje nađena dinamika sIgD se može uklopiti u navedene spoznaje.

Podataka o dinamici alergen-specifičnih protutijela ovog podrazreda imunoglobulina nakon prirodne izloženosti alergenima u literaturi ne nalazim.

6.9. Promjene specifičnih IgE

Iako je u ovom istraživanju nalaz sIgE (metodom ImmunoCAP®) bio isključni kriterij za zdrave ispitanike, imunoenzimskom metodom ELISA su u serumu otkrivene niske razine specifičnih IgE i u zdravih ispitanika. Slično je opisano i u radovima drugih autora koji su u kontrolnoj skupini imali zdrave ispitanike s nalazom alergen-specifičnoga sIgE u serumu i suzama, ali ne i u slini (185). Funkcija sIgE u zdravih osoba nije poznata, ali svakako upućuje na aktivnost i te grane imunološkog odgovora. Afinitet takvih IgE protutijela u zdravih osoba vjerojatno nije visok. U sluznici zdravih ispitanika nađene su i alergen specifični IgE+ limfociti B (258). Čini se kako IgE repertoar alergičnih ispitanika uglavnom nastaje diferencijacijom limfocita B koji proizvode IgG1 (259).

Očekivano je razina sIgE u ispitivanoj skupini bolesnika s atopijom na pelud biljke *Ambrosia elatior* bila visoka. Nakon prirodne ekspozicije alergenu došlo je do dodatnog porasta, što je u skladu s rezultatima dobivenim u brojnim drugim studijama (246). Za porast sIgE u serumu bolesnika s alergijom tijekom sezone odgovorne su memorijski IgE+ limfociti B, ali i *de novo* diferencirane stanice. Uzorci seruma bolesnika s alergijom uzeti su mjesec dana od početka ekspozicije, stoga razina sIgE nije pala uslijed potrošnje vezanjem za alergene, već je bilo dovoljno vremena za aktivaciju memorijskih stanica, ali i ponovljene aktivacije limfocita T i time porasta razine sIgE u serumu.

Za razliku od ispitanika, zdravi pojedinci kontrolne skupine ne pokazuju značajan porast sIgE iako imaju (mada niske) bazalne razine sIgE, pa time i memorijske IgE+ limfocite B. Razlog ne leži u povećanoj specifičnosti IgG protutijela koja također u zdravih ispitanika nisu pokazala statistički značajne razlike. Unatoč prisutnosti malih količina sIgE, zdravi ispitanici nemaju tegoba. Ostaje otvoreno pitanje zbivanja na sluznici, budući da je poznato kako se sIgE može sintetizirati u sluznici (260).

7. Zaključci

Na temelju dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Ostvareni su ciljevi rada: dokazano je postojanje svih izotipova imunoglobulina (A1, A2, D, M, E, G1, G2, G3 i G4) u serumu zdravih ispitanika i bolesnika s atopijskom preosjetljivošću na pelud biljke *Ambrosia elatior* prije sezone polinacije i tijekom vršne ekspozicije ispitanika peludi biljke *Ambrosia elatior*.
2. Unatoč uvriježenom očekivanju kako će zdravi ispitanici tijekom prirodne sezonske ekspozicije alergenu reagirati stvaranjem povećane serumske razine specifičnih protutijela, to nije zabilježeno niti za ijedan izotip slg. Za izotip G2 zabilježen je čak i blagi pad, što može teoretski imati izvjesnu protuupalnu ulogu u neutralizaciji cirkulirajućeg antigena. Slaba reaktivnost svih razreda imunoglobulina u serumu može upućivati na razvijenu toleranciju na alergen, bolji integritet epitelne barijere ili efikasnije stvaranje slg u sluznici zdravih nealergičnih ispitanika.
3. Za razliku od zdravih ispitanika, u bolesnika preosjetljivih na pelud biljke *Ambrosia elatior* nađena je povećana serumska razina specifičnih slgE protutijela tijekom sezone polinacije, što je u skladu s dosadašnjom saznanjima, ali je došlo i do povećanja serumske razine slgA1, IgG3 i slgG4.
4. Porast slgG4 nakon prirodne ekspozicije alergenu u bolesnika s alergijom još je jedan argument koji govori protiv uvriježene teorije "blokirajućih protutijela".

8. Sažetak

Fiziološki način reagiranja na alergene nije do kraja poznat u zdravih ispitanika niti je do kraja poznat imunopatološki mehanizam u bolesnika s alergijom. Unatoč prihvaćenoj teoriji o Th1-tipu imunološkog odgovora u zdravih ispitanika koji bi trebao rezultirati stvaranjem "blokirajućih protutijela" Th1 smjera i time dovesti do izostanka kliničke slike alergijske bolesti, u ovom istraživanju nije uočen takav porast tijekom prirodne ekspozicije peludi biljke *Ambrosia elatior*. Zabilježen je pad serumske razine imunoglobulina slgG2 u zdravih ispitanika, što bi, teoretski, moglo imati ulogu u neutralizaciji cirkulirajućeg alergena.

Osobitosti humoralne imunosti u osoba koje boluju od alergijskih bolesti tijekom prirodne ekspozicije peludi biljke *Ambrosia elatior* nije samo porast slgE, već i porast drugih razreda i podrazreda imunoglobulina koji se tradicionalno svrstavaju u Th1 smjer (A1, G3, G4).

Rezultati ovoga istraživanja pokazuju kako prirodna ekspozicija alergenu iz okoliša ima u alergične osobe sličan učinak na porast slgG4 kao i primjena hiposenzibilizacije. Stoga porast IgG4 vjerojatno nije sam po sebi mehanizam koji dovodi do kliničkog poboljšanja u bolesnika na hiposenzibilizaciji. To je još jedan argument koji, zajedno s visokom razinom serumskog alergena-specifičnoga slgM govori protiv uvriježene "teorije blokirajućih protutijela".

Dobiveni rezultati bi mogli usmjeriti daljnja istraživanja u bolesnika s alergijom, prije svega istraživanja cjelovitosti sluzničkih barijera, dinamike imunoglobulinskih razreda i podrazreda u drugim tjelesnim uzorcima (ispirku nosa i bioptatu sluznice), određivanju razine alergena u krvi i određivanju slgE ovom kvantitativnom metodom, različitosti razina slgM i drugih slg protutijela u bolesnika s anafilaksijom, potencijalnu terapijsku primjenu slgG2, kao i istraživanje imunoloških stanica i njihovih lučevina. Na taj bi se način dobila cjelovitija slika imunoloških zbivanja na alergene u zdravih osoba i bolesnika s alergijom.

9. Summary

The physiologic way of responding to allergens in healthy subjects is not fully understood, nor the immunopathological mechanism in patients with allergies. Despite the accepted theory of Th1-type immune response in healthy subjects that should result in the formation of "blocking antibodies" and thus the absence of a clinical symptoms of allergic disease, no such increase was observed during the natural exposure of the Ambrosia elatior plant pollen. For one immunoglobulin class (sIgG2) slight fall in serum levels was shown, which could, theoretically, play a role in neutralizing the circulating allergen.

The characteristics of humoral immunity in people with allergic diseases during the natural exposure of the pollen of the Ambrosia elatior plant is not only an increase in sIgE levels but also increase in some other classes and subclasses, traditionally classified as Th1 immunoglobulin (A1, G3, G4).

The results of this study show that the natural exposure of allergic persons to the environmental allergen has the similar effect on increase of sIgG4 in allergic persons comparable to those in hyposensitisation. Therefore, the rise of IgG4 is probably not by itself a mechanism that leads to clinical improvement in hyposensitized patients. That argument, together with the high level of allergen-specific serum sIgM levels and also other immunoglobulin classes, dispute against the "theory of blocking antibodies".

The results obtained could be used for further research in patients with allergy, primarily the investigation of total barrier function, dynamics of immunoglobulin classes and subclasses in other body specimens (nose and mucous membrane biopsies), determination of blood allergen levels and determination of sIgE using this quantitative method, possible differences in sIgM and other sIg levels in patients with anaphylaxis, potential therapeutic application of sIgG2 antibodies as well as research in immune cells and their mediators. That way, a more complete insight about immune events in healthy people and patients with allergies could be obtained.

10. Popis literature

1. Papadopoulos N. EAACI - Tackling the Allergy Crisis in Europe - Concerted Policy Action Needed [pristupljeno 7.4.2019]. Dostupno na: <https://www.eaaci.org/images/resources/fellowships/awardees/EAACI-Advocacy-manifesto-Nov2014.pdf>
2. Stipić-Marković A, Pevec B, Pevec MR, Custović A. Prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinitis, conjunctivitis and atopic eczema: ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) in a population of schoolchildren in Zagreb]. *Acta Med Croatica*. 2003;57(4):281-5.
3. Pawankar R, Walkter Canonica G, Holgate ST, Lockey RF. WHO White Book on Allergy 2011-2012. White Book on Allergy. New York: World Health Organization;2001.
4. Khan SJ, Dharmage SC, Matheson MC, Gurrin LC. Is the atopic march related to confounding by genetics and early-life environment? A systematic review of sibship and twin data. *Allergy*. 2018;73:17-28.
5. Taramarcaz P, Lambelet B, Clot B, Keimer C, Hauser C. Ragweed (Ambrosia) progression and its health risks: will Switzerland resist this invasion? *Swiss Med Wkly*. 2005;135(37-38):538-48.
6. Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. 2001 - Atopy. [pristupljeno 1.4.2019]. Dostupno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Atopy>
7. Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. 2001 - Allergy [pristupljeno 1.4.2019]. Dostupno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Allergy>.
8. Krombach JW, Kampe S, Keller CA, Wright PM. Pharaoh Menes' death after an anaphylactic reaction--the end of a myth. *Allergy*. 2004;59(11):1234-5.
9. Reilly D, Taylor MA, McSharry C, Aitchison T. Is homoeopathy a placebo response? Controlled trial of homoeopath-ic potency, with pollen in hayfever as model. *Lancet*. 1986;2(8512):881-6.
10. Merriam-Webster medical dictionary (2018). [Internet]. Springfield, MA: Merriam-Webster Incorporated. Allergy [pristupljeno 09.09.2019.]. Dostupno na: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/allergy>.
11. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T i sur. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy*. 2000;56(9):813-24.
12. Guarnieri M, Balmes JR. Outdoor air pollution and asthma. *Lancet*. 2014 May 3; 383(9928):1581-92.
13. Njå F, Nystad W, Lødrup Carlsen KC, Hetlevik O, Carlsen KH. Effects of early intake of fruit or vegetables in relation to later asthma and allergic sensitization in school-age children. *Acta Paediatr*. 2005;94(2):147-54.
14. Vörös K, Bobvos J, Varró JM, Málnási T, Kói T, Magyar D i sur. Impacts of long-term ragweed pollen load and other potential risk factors on ragweed pollen

- allergy among schoolchildren in Hungary. *Ann Agric Environ Med*. 2018;25(2):307-13.
15. Ortiz RA, Barnes KC. Genetics of allergic diseases. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2015;35(1):19-44.
 16. Hinds DA, McMahon G, Kiefer AK, Do CB, Eriksson N, Evans DM i sur. A genome-wide association meta-analysis of self-reported allergy identifies shared and allergy-specific susceptibility loci. *Nature Genetics*. 2013;45:907-11.
 17. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun*. 2006;7(2):95-100.
 18. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Br. Med. J*. 1989;299:1259-60.
 19. Čustović A, Simpson A. The role of inhalant allergens in allergic airways disease. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012;22(6):393-401.
 20. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 2005;113(7):823-39.
 21. Mattila P, Joenväärä S, Renkonen J, Toppila-Salmi S, Renkonen R. Allergy as an epithelial barrier disease. *Clin Transl Allergy*. 2011;1:5.
 22. Maggi E. The TH1/TH2 paradigm in allergy. *Immunotechnology*. 1998;3(4):233-44.
 23. Abbas A, Lichtman AH, Pillai S. Differentiation and Functions of CD4+ Effector T Cells. U: *Cellular and Molecular Immunology*, 9th Edition. Philadelphia, PA: Elsevier. 2017;225-43.
 24. Kobayashi K, Nakata N, Kai M, Kasama T, Hanyuda Y, Hatano Y. Decreased expression of cytokines that induce type 1 helper T cell/interferon-g responses in genetically susceptible mice infected with *Mycobacterium avium*. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;85(1):112-6.
 25. Mastroeni P, Clare S, Khan S, Harrison JA, Hormaeche CE, Okamura H i sur. Interleukin 18 contributes to host resistance and g interferon production in mice infected with virulent *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun*. 1999;67:478-83.
 26. Buchmeier NA, and Schreiber RD. Requirement of endogenous interferon-g production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1985;82:7404-8.
 27. Fujioka N, Akazawa R, Ohashi K, Fujii M, Ikeda M, Kurimoto M. Interleukin-18 protects mice against acute herpes simplex virus type 1 infection. *J. Virol*. 1999;73:2401-9.
 28. Sareneva T, Julkunen I, and Matikainen S. IFN-a and IL-12 induce IL-18 receptor gene expression in human NK and T cells. *J. Immunol*. 2000;165:1933-8.
 29. Tanaka-Kataoka M, Kunikata T, Takayama S, Iwaki K, Ohashi K, Ikeda M i sur. In vivo antiviral effect of interleukin 18 in a mouse model of vaccinia virus infection. *Cytokine*. 1999;11:593-9.

30. Zhang T, Kawakami K, Qureshi MH, Okamura H, Kurimoto M, Saito A. Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of γ interferon by natural killer cells. *Infect. Immun.* 1997;65:3594-9.
31. Micallef MJ, Yoshida K, Kawai S, Hanaya T, Kohno K, Arai S i sur. In vivo antitumor effects of murine interferon- γ -inducing factor/interleukin-18 in mice bearing syngeneic Meth A sarcoma malignant ascites. *Cancer Immunol. Immunother.* 1997;43:361-7.
32. Wang B, Andre I, Gonzalez A, Katz JD, Aguet M, Benoist C i sur. Interferon- γ impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1997;94:13844-9.
33. Leung BP, McInnes IB, Esfandiari E, Wei XQ, Liew, FY. Combined effects of IL-12 and IL-18 on the induction of collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 2000;164:6495-502.
34. Davidson NJ, Leach MW, Fort MM, Thompson-Snipes L, Kuhn R, Muller W i sur. T helper cell 1-type CD4 β T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1996;184:241-51.
35. Hu HZ, Li GL, Lim YK, Chan SH, Yap EH. Kinetics of interferon- γ secretion and its regulatory factors in the early phase of acute graft-versus-host disease. *Immunology.* 1999;98:379-85.
36. Abbas A, Lichtman AH, Pillai S. Mechanisms and classification of hypersensitivity reactions. U: *Cellular and Molecular Immunology*, 9th Edition. Philadelphia, PA: Elsevier. 2017;417-37.
37. Finkelman FD, Pearce EJ, Urban JF Jr, Sher A. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. *Immunol Today.* 1991;12(3): 62-6.
38. Sher A, Coffman RL. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 1992;10:385-409.
39. Arthur GK, Cruse G. Exon Skipping of Fc ϵ RI β for Allergic Diseases. *Methods Mol Biol.* 2018;1828:503-18.
40. Robinson DS, Larché M, Durham SR. Tregs and allergic disease. *J Clin Invest.* 2004 Nov;114(10):1389-97.
41. Holt PG. Antigen presentation in the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:151-6.
42. Reisinger J, Triendl A, Küchler E, Bohle B, Krauth MT, Rauter I i sur. IFN- γ enhanced allergen penetration across respiratory epithelium augments allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:973-81.
43. Vinhas R, Cortes L, Cardoso I, Mendes VM, Manadas B, Todo-Bom A i sur. Pollen proteases compromise the airway epithelial barrier through degradation of transmembrane adhesion proteins and lung bioactive peptides. *Allergy.* 2011;66:1088-98.
44. Gangl K, Reisinger R, Bernhard D, Campana R, Pree I, Reisinger J i sur. Cigarette smoke facilitates allergen penetration across respiratory epithelium. *Allergy.* 2009;64(3):398-405.

45. Huang YJ, Nelson CE, Brodie EL, Desantis TZ, Baek MS, Liu J i sur. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(2):372-81.
46. Renkonen J, Mattila P, Lehti S, Mäkinen J, Sormunen R, Tervo T i sur. Birch pollen allergen Bet v 1 binds to and is transported through conjunctival epithelium in allergic patients. *Allergy.* 2009;64(6):868-75.
47. Schleh C, Erpenbeck VJ, Winkler C, Lauenstein HD, Nassimi M, Braun A. Allergen particle binding by human primary bronchial epithelial cells is modulated by surfactant protein D. *Respir Res.* 2010;11(1):83.
48. Blume C, Foerster S, Gilles S, Becker WM, Ring J, Behrendt H i sur. Human epithelial cells of the respiratory tract and the skin differentially internalize grass pollen allergens. *J Invest Dermatol.* 2009;129:1935-44.
49. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of immune tolerance to allergens: role of IL-10 and Tregs. *J Clin Invest.* 2014;124(11):4678-80.
50. Barnes KC. An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:16-29.
51. Kubo M. T follicular helper and TH2 cells in allergic responses. *Allergol Int.* 2017;66(3):377-81.
52. Kamer B, Pasowska R, Dółka E, Blomberg A, Rotsztein H. Prevalence of atopic dermatitis in infants during the first six months of life: authors' observations. *Postep Derm Alergol.* 2013;30:277-81.
53. Peden DB. Influences on the development of allergy and asthma. *Toxicology.* 2002;181-182:323-8.
54. Tricon S, Willers S, Smit HA, Burney PG, Devereux G, Frew AJ i sur. Nutrition and allergic disease. *Clin Exp Allergy Rev.* 2006;6:117-88.
55. Vael C, Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr.* 2009;21:794-800.
56. Murr C, Schroecksnadel K, Winkler C, Ledochowski M, Fuchs D. Antioxidants may increase the probability of developing allergic diseases and asthma. *Med Hypotheses.* 2005;64:973-7.
57. Bozzetto S, Carraro S, Giordano G, Boner A, Baraldi E. Asthma, allergy and respiratory infections: the vitamin D hypothesis. *Allergy.* 2012;67:10-7.
58. Gale CR, Robinson SM, Harvey NC, Javaid MK, Jiang B, Martyn CN i sur. Princess Anne Hospital Study Group. Maternal vitamin D status during pregnancy and child outcomes. *Eur J Clin Nutr.* 2008;62:68-77.
59. Devereux G. Allergic disease: Nutrition as a potential determinant of asthma. *Proc Nutr Soc.* 2010;69:1-10.
60. Ghio AJ, Smith CB, Madden MC. Diesel exhaust particles and Airways inflammation. *Curr Opin Pulm Med.* 2012;18:144-50.
61. Arruda LK, Vailes LD, Ferriani VP, Santos AB, Pomés A, Chapman MD. Cockroach allergens and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107:419-28.

62. Ograczyk A, Malec J, Miniszewska J, Zalewska-Janowska A. Psychological aspects of atopic dermatitis and contact dermatitis: stress coping strategies and stigmatization. *Postep Derm Alergol.* 2012;29:14-8.
63. Banken R, Comtois P. Concentration of ragweed pollen and prevalence of allergic rhinitis in 2 municipalities in the Laurentides. *Allerg Immunol* 1992;24:91-4.
64. Wilken JA, Berkowitz R, Kane R. Decrements in vigilance and cognitive functioning associated with ragweed-induced allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2002;89:372-80.
65. Bousquet J, Clark TJ, Hurd S, Khaltaev N, Lenfant C, O'Byrne P i sur. GINA guidelines on asthma and beyond. *Allergy.* 2007;62:102-12.
66. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the GINA dissemination committee report. *Allergy.* 2004;59:469-78.
67. Wijesinghe M, Weatherall M, Perrin K, Crane J, Beasley R. International trends in asthma mortality rates in the 5- to 34-year age group: a call for closer surveillance. *Chest.* 2009;135:1045-9.
68. Grewling L, Jackowiak B, Smith M. Variations in *Quercus* sp. pollen seasons (1996-2011) in Poznań, Poland, in relation to meteorological parameters. *Aerobiologia.* 2014;30:149-59.
69. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JFJ i sur. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:975-87.
70. Hu X, Li X, Hu C1, Qin L, He R, Luo L. Respiratory Syncytial Virus Exacerbates OVA-mediated asthma in mice through C5a-C5aR regulating CD4+T cells Immune Responses. *Sci Rep.* 2017;7(1):15207.
71. Brożek JL, Bousquet J, Agache I, Agarwal A, Bachert C, Bosnic-Anticevich S. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(4):950-8.
72. Global Strategy for Asthma, Global Strategy for Asthma Management and Prevention, NHLBI/WHO Report. NIH Publication No. 95-3659, 1995.
73. Casale TB, Condemni J, LaForce C, Nayak A, Rowe M, Watrous M i sur. Effect of Omalizumab on symptoms of seasonal Allergic rhinitis. A randomised controlled trial. *JAMA.* 2001;23:2956-67.
74. Humbert M, Beasley R, Ayres J, Slavin R, Hébert J, Bousquet J i sur. Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE. *Allergy.* 2005;60:309-16.
75. Vignola AM, Humbert M, Bousquet J, Boulet LP, Hedgecock S, Blogg M i sur. Efficacy and tolerability of anti-immunoglobulin E therapy with omalizumab in patients with concomitant allergic asthma and persistent allergenic rhinitis: SOLAR. *Allergy.* 2004;59:709-17.
76. Noon L. Prophylactic inoculation against hayfever. *Lancet.* 1911;1:1572-3.
77. Soyer OU, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of subcutaneous allergen immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2011;31:175-90.

78. Donovan JP, Buckeridge DL, Briscoe M, Clark RH, Day JH. Efficacy of immunotherapy to ragweed antigen tested by controlled antigen exposure. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1996;77:74-80.
79. Brunet C, Bedard PM, Lavoie A, Jobin M, Herbert J. Allergic rhinitis to ragweed pollen. II. Modulation of histamine releasing factor production by specific immunotherapy, *J Allergy Clin Immunol.* 1992;89:87-94.
80. Norman PS. Safety of allergen immunotherapy (editorial). *J Allergy Clin Immunol.* 1989;84:438-9.
81. André C, Perrin-Fayolle M, Grosclaude M, Couturier P, Basset D, Cornillon J i sur. A doubleblind placebo-controlled evaluation of sublingual immunotherapy with standardised ragweed extracts in patients with seasonal rhinitis. Evidence for a dose response relationship. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003;131:111-8.
82. Van Deusen MA, Angelini BL, Cordoro KM, Seiler BA, Wood L, Skoner DP. Efficacy and safety of oral immunotherapy with standard ragweed extract. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997;78:573-80.
83. Asamoah F, Kakourou A, Dhami S, Lau S, Agache I, Muraro A. Allergen immunotherapy for allergic asthma: a systematic overview of systematic reviews. *Clin Transl Allergy.* 2017;7:25.
84. Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. 2001 - Ambrosia [pristupljeno 1.4.2019]. Dostupno na: <https://en.wiktionary.org/wiki/ambrosia>.
85. Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. 2001 - Asteraceae [pristupljeno 1.4.2019]. Dostupno na: <https://hr.wikipedia.org/wiki/Glavočike>.
86. Peternel R, Culig J, Srnec L, Mitić B, Vukusić I, Hrga I. Variation in ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) pollen concentration in central Croatia, 2002-2003. *Ann Agric Environ Med.* 2005;12(1):11-6.
87. Popovic-Grle S, Vrbica Z, Jankovic M, Klaric I. Different phenotypes of intermittent and persistent respiratory allergy in Zagreb, Croatia. *Ann Agric Environ Med.* 2009;16:137-42.
88. Jarai-Kombdi M, Juhasz M. *Ambrosia Elatior* (L.) in Hungary (1989-1990). *Aerobiologia.* 1993;9:75-8.
89. Dahl A, Strandhede SO, Wihl JA. Ragweed - an allergic risk in Sweden? *Aerobiologia.* 1999;15:293-7.
90. Dervaderics M, Fust G, Otos M, Barok J, Pataky G. Differences in the sensitisation to ragweed and occurrence of late summer allergic symptoms between natives and immigrant workers of the nuclear power plant of Hungary. *Immunol Invest.* 2002;31:29-40.
91. Clot B, Gehrig R, Peeters AG, Schneiter D. Pollen d'ambrosie en Suisse: production locale ou transport? *Eur Ann Allerg Clin Immunol* 2002;34:126-8.
92. Basset IJ, Crompton CW. The biology of canadian weeds. 11. *Ambrosia artemisiifolia* L. and *A. psilostachya* DC. *Can. J. Plant Sci.* 1975;55:463-76.

93. Stipić-Marković A, Sket-Janković N, Čvorišćec B. Evaluation of the potency of the allergen preparation *Ambrosia elatior* using a skin test and the inhibition radioallergosorbent test. *Lijec Vjesn.* 1992;114(1-4):53-6.
94. Bouley J, Groeme R, Le Mignon M, Jain K, Chabre H, Bordas-Le Floch V i sur. Identification of the cysteine protease Amb a 11 as a novel major allergen from short ragweed. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(4):1055-64.
95. Chapman MD, Pomés A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature and structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;119(2):414-20.
96. de la Torre Morín F, Sánchez Machín I, García Robaina JC, Fernández-Caldas E, Sánchez Triviño M. Clinical cross-reactivity between *Artemisia vulgaris* and *Matricaria chamomilla* (chamomile). *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2001;11(2):118-22.
97. Hirschwehr R, Heppner C, Spitzauer S, Sperr WR, Valent P, Berger U i sur. Identification of common allergenic structures in mugwort and ragweed pollen. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;101:196-206.
98. Canis M, Becker S, Gröger M, Kramer MF. IgE reactivity patterns in patients with allergic rhinoconjunctivitis to ragweed and mugwort pollens. *Am J Rhinol Allergy.* 2012;26(1):31-5.
99. Murphy K, Casey W. *The immune system in health and disease.* U: Janeway's immunobiology, 9th Edition, New York, USA: Garland Science Publishing, 2017;533-749.
100. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 2002;20:165-96.
101. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol.* 1966;97(1):75-85.
102. Halonen M, Stern D, Lyle S, Wright A, Taussig L, Martinez FD. Relationship of total serum IgE levels in cord and 9-month sera of infants. *Clin Exp Allergy.* 1991;21(2):235-41.
103. Szépfalusi Z, Huber WD, Ebner C, Granditsch G, Urbanek R. Early sensitization to airborne allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995;107(4):595-8.
104. Niederberger V, Niggemann B, Kraft D, Spitzauer S, Valenta R. Evolution of IgM, IgE and IgG(1-4)antibody responses in early childhood monitored with recombinant allergen components: implications for class switch mechanisms. *Eur J Immunol.* 2002;32(2):576-84.
105. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(Suppl 2):73-80.
106. Manz RA, Arce S, Cassese G, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol.* 2002;14:517-21.
107. Mori JC, Pires MC, Galvão C, Ferreira de Mello J, Golcher FM, Montealegre F. Determination of *Blomia tropicalis*-specific IgE and IgG subclasses in atopic dermatitis patients. *Allergy.* 2001;56(2):180-4.

108. Jabara HH, Loh R, Ramesh N, Vercelli D, Geha RS. Sequential switching from mu to epsilon via gamma 4 in human B cells stimulated with IL-4 and hydrocortisone. *Mian Yi Xue Za Zhi*. 1993;151(9):4528-33.
109. Karagiannis SN, Wang Q, East N, Burke F, Riffard S, Bracher MG i sur. Activity of human monocytes in IgE antibody-dependent surveillance and killing of ovarian tumor cells. *Eur J Immunol*. 2003;33(4):1030-40.
110. Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunology*. 2008;1(1):11-22.
111. Kawamura S, Saitou N, Ueda S. Concerted evolution of the primate immunoglobulin alpha-gene through gene conversion. *J Biol Chem*. 1992;267(11):7359-67.
112. Snoeck V, Peters IR, Cox E. The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Veterinary Research*. 2006;37(3):455-67.
113. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine*. 2005;11:45-53.
114. Vazquez-Ortiz M, Pascal M, Juan M, Alsina L, Martín-Mateos MA i sur. Serum allergen-specific IgA is not associated with natural or induced tolerance to egg in children. *Allergy*. 2013;68(10):1327-32.
115. Konstantinou GN, Nowak-Węgrzyn A, Bencharitiwong R, Bardina L, Sicherer SH, Sampson HA. Egg-white-specific IgA and IgA2 antibodies in egg-allergic children: is there a role in tolerance induction? *Pediatr Allergy Immunol*. 2014;25(1):64-70.
116. Payette K, Weiss NS. Salivary IgA levels in atopic children. *Ann Allergy*. 1977;39(5):328-31.
117. Wines BD, Hogarth PM. IgA receptors in health and disease. *Tissue Antigens*. 2006;68(2):103-14.
118. Monteiro RC. The role of IgA and IgA Fc receptors as anti-inflammatory agents. *J Clin Immunol*. 2010;30(Suppl 1):61-4.
119. Pasquier B, Lepelletier Y, Baude C, Hermine O, Monteiro RC. Differential expression and function of IgA receptors (CD89 and CD71) during maturation of dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2004;76(6):1134-41.
120. Dullaers M, Li D, Xue Y, Ni L, Gayet I, Morita R i sur. A T cell-dependent mechanism for the induction of human mucosal homing immunoglobulin A-secreting plasmablasts. *Immunity*. 2009;30(1):120-9.
121. Furtado PB, Whitty PW, Robertson A, Eaton JT, Almogren A, Kerr MA i sur. Solution structure determination of monomeric human IgA2 by X-ray and neutron scattering, analytical ultracentrifugation and constrained modelling: a comparison with monomeric human IgA1. *J Mol Biol*. 2004;338(5):921-41.
122. Senior BW, Loomes LM, Kerr MA. Microbial IgA proteases and virulence. *Rev Med Microbiol*. 1991;2:200-7.
123. Dodev TS, Bowen H, Shamji MH, Bax J, Beavil A, McDonnell JM. Inhibition of allergen dependent IgE activity by antibodies of the same specificity but different class. *Allergy*. 2015;70(6):720-4.

124. Coleman PM. Structure of the human Ab molecule K01 (IgG1): an electron density map at 5 Å resolution. *J.Mol. Biol.* 1976;100:257.
125. Abramovr VM. Conformational properties of human IgG subclasses. *Biochim.Biophys.Acta.* 1983;742:295.
126. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front Immunol.* 2014;5:520.
127. Saluk PH, Clem LW. Unique molecular weight of the heavy chain of human IgG3 proteins. *J.Immunol.* 1971;107:298.
128. Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy.* 2009;39(4):469-77.
129. Platts-Mills TA, von Maur RK, Ishizaka K, Norman PS, Lichtenstein LM. IgA and IgG anti-ragweed antibodies in nasal secretions. Quantitative measurements of antibodies and correlation with inhibition of histamine release. *J Clin Invest.* 1976;1:1041-50.
130. Aalberse RC, Van Milligen F, Tan KY, Stapel SO. Allergen-specific IgG4 in atopic disease. *Allergy.* 1993;48:559.
131. Aalberse RC. Specific IgE and IgG responses in atopic versus nonatopic subjects. *Am J Respir Crit Care.* 2000;162(3):124-7.
132. Spector SL. The role of allergy in sinusitis in adults. *J Allergy Clin Immunol.* 1992;90(3):518-20.
133. Ohta Y, Flajnik M. IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(28):10723-8.
134. Chen K, Cerutti A. New insights into the enigma of immunoglobulin D. *Immunol Rev.* 2010;237(1):160-79.
135. Min JY, Nayak JV, Hulse KE, Stevens WW, Raju PA, Huang JH i sur. Evidence for altered levels of IgD in the nasal airway mucosa of patients with chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(6):1562-71.
136. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM i sur. Interleukin 17-producing CD41 effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages 325. *Nat. Immunol.* 2005;6:1123-32.
137. Schleimer RP, Kato A, Peters A, Conley D, Kim J, Liu MC i sur. Epithelium, inflammation, and immunity in the upper airways of humans: studies in chronic rhinosinusitis. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6:288-94.
138. O'Shea JJ, Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity.* 2012;36:542-50.
139. Ballantyne SJ, Barlow JL, Jolin HE, Nath P, Williams AS, Chung KF i sur. Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:1324-31.
140. Humphreys NE, Xu D, Hepworth MR, Liew FY, Grecis RK. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J Immunol.* 2008;180(4):2443-9.

141. Sakurai K, Takenaka H, Yoneda Y, Tashiro-Yamaji J, Yamamoto Y, Lee K i sur. IgE production after four routes of injections of Japanese cedar pollen allergen without adjuvant: crucial role of resident cells at intraperitoneal or intranasal injection site in the production of specific IgE toward the allergen. *Microbiol Immunol.* 2005;49(5):433-41.
142. Dannemann A, van Ree R, Kulig M, Bergmann RL, Bauer P, Forster J. Specific IgE and IgG4 immune responses to tetanus and diphtheria toxoid in atopic and nonatopic children during the first two years of life. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1996;111:262–267.
143. Siebenlist U, Brown K, Claudio E. Control of lymphocyte development by nuclear factor-kB. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5:435-45.
144. Palm NW, Rosenstein RK, Medzhitov R. Allergic host defences. *Nature.* 2012;484(7395):465-72.
145. Wong SH, Walker JA, Jolin HE, Drynan LF, Hams E, Camelo A i sur. Transcription factor ROR α is critical for nuocyte development. *Nat Immunol.* 2012;13(3):229-36.
146. Stumbles, PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate Th2 responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J. Exp. Med.* 1998;188:2019-31.
147. Schweitzer AN, Borriello F, Wong RC, Abbas AK, Sharpe AH. Role of costimulators in T cell differentiation: studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86. *J Immunol.* 1997;158(6):2713-22.
148. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124:783-801.
149. Trifilieff A, Fujitani Y, Coyle AJ, Kopf M, Bertrand C. IL-5 deficiency abolishes aspects of airway remodelling in a murine model of lung inflammation. *Clin. Exp. Allergy.* 2001;31:934-42.
150. Takatsu K, Nakajima H. IL-5 and eosinophilia. *Curr Opin Immunol.* 2008;20:288-94.
151. Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, Matthaei KI, Young IG. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med.* 1996;183:195-201.
152. Packard KA, Khan MM. Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. *Int Immunopharmacol.* 2003;3:909-20.
153. Horr B, Borck H, Thurmond R, Grösch S, Diel F. STAT1 phosphorylation and cleavage is regulated by the histamine (H4) receptor in human atopic and non-atopic lymphocytes. *Int Immunopharmacol.* 2006;6:1577-85.
154. Takeba Y, Nagafuchi H, Takeno M, Kashiwakura J, Suzuki N. Txk, a member of nonreceptor tyrosine kinase of Tec family, acts as a Th1 cell-specific transcription factor and regulates IFN-gamma gene transcription. *J Immunol.* 2002;168(5):2365-70.
155. Sloan-Lancaster J, Presley J, Ellenberg J, Yamazaki T, Lippincott-Schwartz J, Samelson LE. ZAP-70 association with T cell receptor zeta (TCRzeta):

- fluorescence imaging of dynamic changes upon cellular stimulation. *J Cell Biol.* 1998;143(3):613-24.
156. Jartti T, Korppi M. Rhinovirus-induced bronchiolitis and asthma development. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2011;22:350-5.
 157. McWilliam A. S, Nelson D, Thomas J. A, Holt P. G. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J. Exp. Med.* 1994;179:1331-6.
 158. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(b)CD25(b) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor b. *J. Exp. Med.* 2001;194, 629-44.
 159. Sanchez Rodriguez R, Pauli ML, Neuhaus IM, Yu SS, Arron ST, Harris HW, Yang SH i sur. Memory regulatory T cells reside in human skin. *J Clin Invest.* 2014;124(3):1027-36.
 160. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(3):621-31.
 161. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S i sur. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity.* 2001;15(6):985-95.
 162. Kearley J, Robinson DS, Lloyd CM. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(3):617-24.
 163. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L i sur. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature.* 2007;448(7152):480-3.
 164. Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S. Th17 and allergy. *Allergol Int.* 2008;57(2):121-34.
 165. Tamura K, Arakawa H, Suzuki M, Kobayashi Y, Mochizuki H, Kato M i sur. Novel dinucleotide repeat polymorphism in the first exon of the STAT-6 gene is associated with allergic diseases. *Clin Exp Allergy.* 2001;31:1509-14.
 166. Weidinger S, Klopp N, Wagenpfeil S, Rümmler L, Schedel M, Kabesch M i sur. Association of a STAT 6 haplotype with elevated serum IgE levels in a population based cohort of white adults. *J Med Genet.* 2004;41:658-63.
 167. Zhang Q, Su HC. Hyperimmunoglobulin E syndromes in pediatrics. *Curr Opin Pediatr.* 2011;23:653-8.
 168. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD i sur. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature.* 2000;406(6793):309-14.
 169. Frischmeyer-Guerrero PA, Keet CA, Guerrero AL, Chichester KL, Bieneman AP, Hamilton RG i sur. Modulation of dendritic cell innate and adaptive immune functions by oral and sublingual immunotherapy. *Clin Immunol.* 2014;155(1):47-59.

170. Yunginger JW, Gleich JG. Seasonal Changes in IgE Antibodies and Their Relationship to IgG Antibodies during Immunotherapy for Ragweed Hay Fever. *J Clin Invest.* 1973;52(5):1268-75.
171. Zieliński AE. Specific immunotherapy in pollinosis: II. Forecasting changes in certain cytoimmunological indicators after four years of immunotherapy in pollinosis. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 1996;6(6):364-70.
172. Salpietro DC, Masaracchio A, Turiaco A, Di Bella MR, Toscano V, Merlino MV. Serum IgD levels in children with atopic asthma. A longitudinal study. *Minerva Pediatr.* 2001;53(1):1-5.
173. Platts-Mills TA. Local production of IgG, IgA and IgE antibodies in grass pollen hay fever. *J Immunol.* 1979;122(6):2218-25.
174. Chapman MD, Rowntree S, Mitchell EB, Di Prisco de Fuenmajor MC, Platts-Mills TA. Quantitative assessments of IgG and IgE antibodies to inhalant allergens in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1983;72(1):27-33.
175. Aalberse RC, Schuurman J. IgG4 breaking the rules. *Immunology.* 2002;105:9-19.
176. Hales BJ, Martin AC, Pearce LJ, Laing IA, Hayden CM, Goldblatt J i sur. IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;1:361-7.
177. Niederberger V, Ring J, Rakoski J. Antigens Drive Memory IgE Responses in Human Allergy via the Nasal Mucosa. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;142:133-44.
178. Keen C, Johansson S, Reinholdt J, Benson M, Wennergren G. Bet v 1-specific IgA increases during the pollen season but not after a single allergen challenge in children with birch pollen-induced intermittent allergic rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16(3):209-16.
179. Ventura MT, Rodriguez-Perez R, Caballero ML, Garcia-Alonso M, Antonicelli L, Asero R. IgE, IgG1 and IgG4 response to specific allergens in sensitized subjects showing different clinical reactivity to *Anisakis simplex*. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2017;49(2):52-8.
180. Scott-Taylor TH, O'B Hourihane J, Strobel S. Correlation of allergen-specific IgG subclass antibodies and T lymphocyte cytokine responses in children with multiple food allergies. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010;21(6):935-44.
181. Palosuo K, Brummer-Korvenkontio H, Mikkola J. Seasonal Increase in Human IgE and IgG4 Antisaliva Antibodies to *Aedes* Mosquito Bites. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997;114:367-72.
182. Platts-Mills TA, Woodfolk JA. Allergens and their role in the allergic immune response. *Immunol Rev.* 2011;242(1):51-68.
183. Akdis M. Immune tolerance in allergy. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(6):700-7.
184. Barberi S, Villa MP, Pajno GB, La Penna F, Barreto M, Cardelli P i sur. Immune response to sublingual immunotherapy in children allergic to mites. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2011;25(4):627-34.

185. Miranda DO, Silva AO, Fernandes JFC, Queiros MGJ, Chiba HF, Ynoue LH. Serum and Salivary IgE, IgA, and IgG4 Antibodies to *Dermatophagoides pteronyssinus* and Its Major Allergens, Der p1 and Der p2, in Allergic and Nonallergic Children. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:302739.
186. Purohit A, Laffer S, Metz-Favre C, Verot A, Kricek F, Valenta R i sur. Poor association between allergen-specific serum immunoglobulin E levels, skin sensitivity and basophil degranulation: a study with recombinant birch pollen allergen Bet v 1 and an immunoglobulin E detection system measuring immunoglobulin E capable of binding to Fc epsilon RI. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(2):186-92.
187. Kolopp-Sarda MN, Moneret-Vautrin DA, Gobert B, Kanny G, Guerin L, Faure GC i sur. Polyisotypic antipeanut-specific humoral responses in peanut-allergic individuals. *Clin Exp Allergy.* 2001;31(1):47-53.
188. Codina R, Arduzzo L, Lockey RF, Crisci C, Bertoya N. Specific immunoglobulins to soybean hull allergens in soybean asthma. *Chest.* 1997;111(1):75-80.
189. Zhou C, Liu Z, Sui W, Gu D, Li Y, Zou H. Detection of serum food specific antibodies of 6 common foods in patients with IgA nephropathy. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2014;34(3):419-22.
190. Konstantinou GN, Nowak-Węgrzyn A, Bencharitiwong R, Bardina L, Sicherer SH, Sampson HA. Egg-white-specific IgA and IgA2 antibodies in egg-allergic children: is there a role in tolerance induction? *Pediatr Allergy Immunol.* 2014;25(1):64-70.
191. Piirainen L, Haahtela S, Helin T, Korpela R, Haahtela T, Vaarala O. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on rBet v1 and rMal d1 specific IgA in the saliva of patients with birch pollen allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008;100(4):338-42.
192. Williams JW, Tjota MY, Sperling AI. The contribution of allergen-specific IgG to the development of th2-mediated airway inflammation. *J Allergy.* 2012;2012:236075.
193. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood.* 2012;119(24):5640-9.
194. Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116:608-13.
195. Groh N, von Loetzen CS, Subbarayal B, Möbs C, Vogel L, Hoffmann A i sur. IgE and allergen-specific immunotherapy-induced IgG4 recognize similar epitopes of Bet v 1, the major allergen of birch pollen. *Clin Exp Allergy.* 2017;47(5):693-703.
196. Senti G, von Moos S, Tay F, Graf N, Johansen P, Kündig TM i sur. Determinants of efficacy and safety in epicutaneous allergen immunotherapy: summary of three clinical trials. *Allergy.* 2015;70(6):707-10.
197. Ostojić V. Increased specific immunoglobulin G4 antibodies induced by natural exposure to ambrosia pollen in patients with allergy. *Allergy Asthma Proc.* 2016;37(2):115-20.

198. Ferrer M, Sanz ML, Sastre J, Bartra J, del Cuvillo A, Montoro J i sur. Molecular diagnosis in allergology: application of the microarray technique. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(Suppl 1):19-24.
199. Chen KW, Focke-Tejkl M, Blatt K, Kneidinger M, Gieras A, Dall'Antonia F i sur. Carrier-bound nonallergenic Der p 2 peptides induce IgG antibodies blocking allergen-induced basophil activation in allergic patients. *Allergy*. 2012;67(5):609-21.
200. Siman IL, de Aquino LM, Ynoue LH, Miranda JS, Pajuaba AC, Cunha-Júnior JP i sur. Allergen-Specific IgG Antibodies Purified from Mite-Allergic Patients Sera Block the IgE Recognition of Dermatophagoides pteronyssinus Antigens: An In Vitro Study. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:657424.
201. Pereira EA, Silva DA, Cunha-Júnior JP. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. *Allergy*. 2005;60(3):401-6.
202. Ohashi Y, Nakai Y, Okamoto H, Ohno Y, Sakamoto H, Tanaka A i sur. Significant correlation between symptom score and IgG4 antibody titer following long-term immunotherapy for perennial allergic rhinitis. *Annals of Otolaryngology & Laryngology*. 1997;106(6):483-9.
203. Benson M, Reinholdt J, Cardell LO. Allergen-reactive antibodies are found in nasal fluids from patients with birch pollen-induced intermittent allergic rhinitis, but not in healthy controls. *Allergy*. 2003;58(5):386-92.
204. Smith KA, Gray NJ, Cheek E. Characterisation of CD154+ T cells following ex vivo birch allergen stimulation defines a close relationship between T cell subsets in healthy volunteers. *BMC Immunol*. 2013;14:14.
205. Wachholz PA, Durham SR. Induction of 'blocking' IgG antibodies during immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(9):1171-4.
206. Özcan C, Metin A, Erkoçoğlu M, Kocabaş CN. Allergic diseases in children with primary immunodeficiencies. *Turk J Pediatr*. 2014;56(1):41-7.
207. Buckley RH. Clinical and immunologic features of selective IgA deficiency. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1975;11(1):134-42.
208. Yel L. Selective IgA deficiency. *J Clin Immunol*. 2010;30(1):10-16.
209. Heijink IH1, Nawijn MC, Hackett TL. Airway epithelial barrier function regulates the pathogenesis of allergic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(5):620-30.
210. Mattila P, Renkonen J, Toppila-Salmi S, Parviainen V, Joenväärä S, Alff-Tuomala S i sur. Time-series nasal epithelial transcriptomics during natural pollen exposure in healthy subjects and allergic patients. *Allergy*. 2010;65:175-83.
211. Georas SN, Rezaee F. Epithelial barrier function: at the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(3):509-20.
212. Blume C, Foerster S, Gilles S, Becker WM, Ring J, Behrendt H i sur. Human epithelial cells of the respiratory tract and the skin differentially internalize grass pollen allergens. *J Invest Dermatol*. 2009;129:1935-44.
213. Corthésy B. Multi-Faceted Functions of Secretory IgA at Mucosal Surfaces. *Front Immunol*. 2013;4:185.

214. Cady CT, Powell MS, Harbeck RJ, Giclas PC, Murphy JR, Katial RK i sur. IgG antibodies produced during subcutaneous allergen immunotherapy mediate inhibition of basophil activation via a mechanism involving both FcγRIIA and FcγRIIB. *Immunol Lett.* 2010;130(1-2):57–65.
215. Wu LC, Scheerens H. Targeting IgE production in mice and humans. *Curr Opin Immunol.* 2014;31:8-15.
216. Talay O, Yan D, Brightbill HD et al. IgE(+) memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway. *Nat Immunol.* 2012;13(4):396
217. Huizhong X, Dolpady J, Wabl M, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *J Exp Med.* 2012; 209(2): 353-64.
218. Ciprandi G, De Amici M, Tosca M, Marseglia G. Allergen-specific Ig classes in non-allergic individuals. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2010;24(3):335-40.
219. Fling JA, Ruff ME, Parker WA, Whisman BA, Martin ME, Moss RB i sur. Suppression of the late cutaneous response by immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 1989;83(1):101-9.
220. Collins A, Jackson K. A Temporal Model of Human IgE and IgG Antibody Function. *Front Immunol.* 2013;235(4):1-6.
221. Ma XP, Muzhapaer D. Efficacy of sublingual immunotherapy in children with dust mite allergic asthma. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2010;12(5):344-7.
222. Baron-Bodo V, Horiot S, Lautrette A, Chabre H, Drucbert AS, Danzé PM i sur. Heterogeneity of antibody responses among clinical responders during grass pollen sublingual immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 2013;43(12):1362-73.
223. Gadermaier E, Staikuniene J, Scheibelhofer S. Recombinant allergen-based monitoring of antibody responses during injection grass pollen immunotherapy and after 5 years of discontinuation. *Allergy.* 2011;66(9):1174-82.
224. Thunberg S, Neimert-Andersson T, Cheng Q, Wermeling F, Bergström U, Swedin L i sur. Prolonged antigen-exposure with carbohydrate particle based vaccination prevents allergic immune responses in sensitized mice. *Allergy.* 2009;64(6):919-26.
225. Milovanovic M, Heine G, Zuberbier T, Worm M. Allergen extract-induced interleukin-10 in human memory B cells inhibits immunoglobulin E production. *Clin Exp Allergy.* 2009;39(5):671-8.
226. Xiong H, Dolpady J, Wabl M, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *J Exp Med.* 2012;209(2):353-64.
227. Inoue Y, Hosoi S, Hirao T, Mikawa H. Dermatophagoides pteronyssinus specific IgM antibody and its complement activation in children with bronchial asthma. *Alerugi.* 1991;40(6):581-6.
228. Hartog G, van Neerven RJ, Boot JD, Jansen AP, Savelkoul HF. House dust mite-specific IgA2 is associated with protection against eczema in allergic patients. *Allergy.* 2016;71(4):563-6.
229. Kitani S, Ito K, Miyamoto T. IgG, IgA, and IgM antibodies to mite in sera and sputa from asthmatic patients. *Ann Allergy.* 1985;55(4):612-20.

230. Böttcher MF, Häggström P, Björkstén B, Jenmalm MC. Total and allergen-specific immunoglobulin A levels in saliva in relation to the development of allergy in infants up to 2 years of age. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(9):1293-8.
231. Scadding GW, Shamji MH, Jacobson MR, Wilson D, Lima MT, Pitkin L i sur. Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(4):598-606.
232. Maeta A, Matsushima M, Muraki N, Asano M, Takaoka Y, Kameda M i sur. Low-Dose Oral Immunotherapy Using Low-Egg-Allergen Cookies for Severe Egg-Allergic Children Reduces Allergy Severity and Affects Allergen-Specific Antibodies in Serum. *Int Arch Allergy Immunol*. 2018;175(1-2):70-76.
233. Pilette C, Nouri-Aria KT, Jacobson MR, Wilcock LK, Detry B, Walker SM i sur. Grass pollen immunotherapy induces an allergen-specific IgA2 antibody response associated with mucosal TGF-beta expression. *J Immunol*. 2007;178(7):4658-66.
234. Wayne P, Foster S, Connolly J, Bazzaz F, Epstein P. Production of allergenic pollen by ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) is increased in CO₂-enriched atmospheres. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002;88(3):279-82.
235. Gehlhar K, Schlaak M, Becker W, Bufe A. Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(4):497-506.
236. Suman LG, Vijaya LV, Surekha RH, Anuradha B, Murthy KJR. Specific IgG and its subclass antibodies after immunotherapy with gynandropsis gynandra. *Lung India*. 2005;22(3):77-80.
237. Park HS, Nahm DH, Kim HY, Suh YJ, Cho JW, Kim SS i sur. Clinical and immunologic changes after allergen immunotherapy with Hop Japanese pollen. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;86:444-8.
238. Nahm DH, Park HS, Kim CW, Park JW, Hong CS. Seasonal variation of IgG subclass antibodies to house dust mite in sera from mite-sensitive asthmatic patients. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1998;80(5):411-5.
239. Golden D. What is anaphylaxis? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7(4):331-6.
240. Kaneko M1, Swanson MC, Gleich GJ. Allergen-specific IgG1 and IgG3 through Fc gamma RII induce eosinophil degranulation. *J Clin Invest*. 1995;95(6):2813-21.
241. Aydogan M, Mete N, Yazı D, Akkoc T, Ozdemir C, Blaser K i sur. Comparison of Der p1-specific antibody levels in children with allergic airway disease and healthy controls. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007;18(4):320-5.
242. Carballido JM, Carballido-Perrig N, Kägi MN, Meloen RH, Wüthrich B, Heusser CH i sur. T cell epitope specificity in human allergic and non-allergic subjects to bee venom phospholipase A2. *J Immunol*. 1993;150:3582-91.
243. Pifferi M, Baldini G, Marrazzini G, Baldini M, Ragazzo V, Pietrobelli A i sur. Benefits of immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides*

- pteronysinus extract in asthmatic children: a three-year prospective study. *Allergy*. 2002;57(9):785-90.
244. Jay D. Immune mechanisms of sublingual immunotherapy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014;14(11):473.
245. Palomares O, Martín-Fontecha M, Lauener R. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β . *Genes Immun*. 2014;15(8):511-520.
246. Palomares O, Rückert B, Jartti T, Kucuksezer UC, Puhakka T, Gomez E i sur. Induction and maintenance of allergen-specific FOXP3+ Treg cells in human tonsils as potential first-line organs of oral tolerance. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(2):510-20.
247. Tabar AI, Echechipía S, García BE, Olaguibel JM, Lizaso MT, Gómez B i sur. Double-blind comparative study of cluster and conventional immunotherapy schedules with *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(1):109-18.
248. Antúnez C, Mayorga C, Corzo JL, Jurado A, Torres MJ. Two year follow-up of immunological response in mite-allergic children treated with sublingual immunotherapy. Comparison with subcutaneous administration. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008;19(3):210-8.
249. Lue KH1, Lin YH, Sun HL, Lu KH, Hsieh JC, Chou MC. Clinical and immunologic effects of sublingual immunotherapy in asthmatic children sensitized to mites: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006;17(6):408-15.
250. van der Giessen M, Homan WL, van Kernbeek G, Aalberse RC, Dieges PH. Subclass typing of IgG antibodies formed by grass pollen-allergic patients during immunotherapy. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1976;50(5):625-40.
251. Jutel M, Akdis M, Budak F i sur. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2003;33(5):1205-14.
252. Grammer LC, Shaughnessy MA, Suszko IM, Shaughnessy JJ, Patterson R. Persistence of efficacy after a brief course of polymerized ragweed allergen: a controlled study. *J Allergy Clin Immunol*. 1984;73(4):484-9.
253. Gleich GJ, Zimmermann BS, Henderson LL, Yunginger JW. Effects of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six year prospective study. *J Allergy Clin Immunol*. 1982;70:261-71.
254. Meiler F, Zumkehr J, Klunker S, Rückert B, Akdis CA, Akdis M. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med*. 2008;205(12):2887-98.
255. Jarvis D, Zock JP, Heinrich J, Svanes C, Verlato G, Olivieri M i sur. Cat and dust mite allergen levels, specific IgG and IgG4, and respiratory symptoms in adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;1:697-704.
256. Shan M, Carrillo J, Yeste A, Gutzeit C, Segura-Garzón D, Walland AC i sur. Secreted IgD Amplifies Humoral T Helper 2 Cell Responses by Binding Basophils via Galectin-9 and CD44. *Immunity*. 2018;49(4):709-24.

257. Nguyen TG. Immune-modulation via IgD B-cell receptor suppresses allergic skin inflammation in experimental contact hypersensitivity models despite of a Th2-favoured humoral response. *Immunol Lett.* 2018;203:29-39.
258. KleinJan A, Vinke JG, Severijnen LW, Fokkens WJ. Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients. *Eur Respir J.* 2000;15(3):491-7.
259. Diaz-Sanchez D, Garcia MP, Wang M, Jyrala M, Saxon A. Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(6):1183-8.
260. Looney TJ, Lee JY, Roskin KM, Hoh RA, King J, Glanville J. Human B-cell isotype switching origins of IgE. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(2):579-86.

11. Biografija

Vedran Ostojić je rođen 26. srpnja 1967. godine u Supetru. Osnovnu i srednju školu pohađao je u Sinju. Završio je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 1996. godine. Ubrzo po diplomiranju započeo je obvezni dvogodišnji pripravnički staž u Kliničkoj bolnici Sveti Duh u Zagrebu, gdje od tada do danas neprekidno radi.

Godine 1999. upisuje poslijediplomski doktorski studij "Biomedicina" Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Specijalistički ispit iz interne medicine položio je 2006. godine, a subspecijalistički ispit iz pulmologije 2016. godine. Trenutno je zaposlen na funkciji v.d. voditelja Odjel za kliničku imunologiju, reumatologiju i pulmologiju Klinike za unutarnje bolesti KB Sveti Duh.

Član je Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za alergologiju i kliničku imunologiju, Hrvatskog pulmološkog društva te Hrvatskog društva za zdravstvenu ekologiju.

Do sada je publicirao više međunarodno indeksiranih radova, poglavlja u knjizi, kongresnih priopćenja iz područja imunologije, alergologije, pulmologije, medicinske informatike i telemedicine.