

# Učestalost pozitivnih nalaza ukupnog i specifičnih IgE kod pacijenata s atopijskim dermatitisom i astmom

---

Cerovac, Paula

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:938256>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Paula Cerovac**

**Učestalost pozitivnih nalaza ukupnog i  
specifičnih IgE kod pacijenata s atopijskim  
dermatitisom i astmom**

**DIPLOMSKI RAD**

predan Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen u suradnji s Odjelom za laboratorijsku imunologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dunje Rogić, spec. med. biokemije.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Dunji Rogić, spec. med. biokemije, na pristupačnosti, uloženom trudu i korisnim savjetima tijekom izrade ovog rada. Zahvaljujem i Josipu Kneževiću, mag. med. biochem., na izrazitoj pomoći i uloženom trudu pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem svima koji su mi na bilo koji način pomogli tijekom studiranja, a posebno mojoj najvećoj podršci, roditeljima.

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Imunosne preosjetljivosti .....	1
1.1.1. Antitijela .....	3
1.1.2. Alergeni .....	4
1.1.3 Alergijske manifestacije .....	5
1.1.4 Liječenje .....	5
1.1.5. Dijagnosticiranje .....	6
1.1.6 Križna reaktivnost .....	8
1.2. Atopijski dermatitis .....	10
1.3. Astma .....	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	17
3. MATERIJALI I METODE .....	18
3.1. Uzorci i populacija .....	18
3.2 Unutarnja analitička kontrola .....	19
3.3 Načelo metode .....	19
3.4 Analiti .....	20
3.5. Statističke metode .....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	21
5. ZAKLJUČAK .....	28
6. LITERATURA .....	29
7. SAŽETAK .....	31
7. SUMMARY .....	32
8. PRILOZI .....	33
8.1. Popis skraćénica .....	33

# 1. UVOD

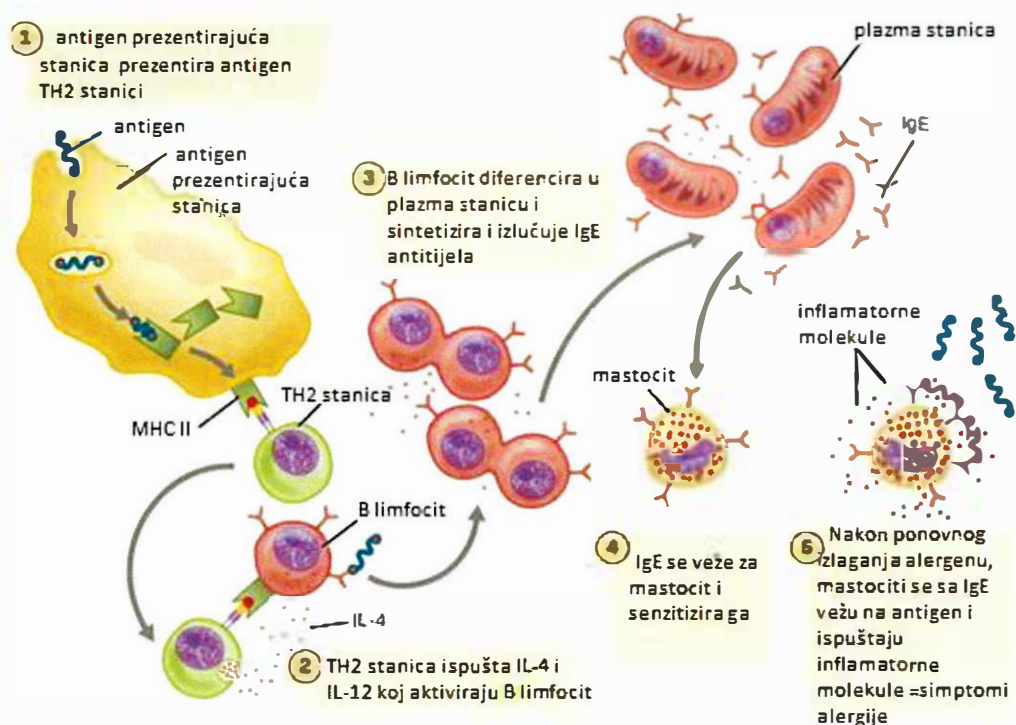
## 1.1. Imunosne preosjetljivosti

Jedna skupina bolesti koje su prouzročene imunosnom reakcijom nazivaju se bolesti preosjetljivosti. Taj naziv potječe iz kliničke odrednice imunosti kao osjetljivosti, a temelji se na opažanju da jedinice koje su bile izložene određenom antigenu pokazuju prepoznatljivu reakciju, tj. osjetljive su na ponovni dodir s istim antigenom. Ponekad je imunosni odgovor nedovoljno kontroliran, neprimjereno usmjeren na tkiva domaćina ili je potaknut bezazlenim komenzalnim mikroorganizmima ili antigenima iz okoliša. U takvim slučajevima imunosni odgovor, koji je inače koristan, postaje uzrok bolesti. Bolesti preosjetljivosti uobičajeno se dijele prema obliku imunosne reakcije i izvršnim mehanizmima odgovornima za oštećenje stanica i tkiva. (Abbas i sur; 2018)

Tip I preosjetljivosti naziva se neposredna (ili anafilaktička), prouzročena je specifičnim IgE protutijelima koji su specifični za antigene iz okoliša i ona je najčešći oblik preosjetljivosti. Ujedno tu spadaju i alergije ili atopijske bolesti, a one su prototip bolesti prouzročene aktivacijom pomagačkih T-stanica (češće Th2) koje izlučuju citokine IL4, IL5 i IL13 s kojima se u konačnici potiče stvaranje protutijela IgE i upala. Tip II preosjetljivosti prouzročen je protutijelima IgG i IgM. Ona mogu prouzročiti oštećenje tkiva aktivacijom komplementa, angažiranjem upalnih stanica ili ometanjem funkcije stanica. Neka od tih protutijela specifična su za određene antigene pa se mogu naći vezana za stanice i tkiva, ali se mogu naći i kao slobodna u cirkulaciji. Oblik preosjetljivosti tipa III potpomognut je imunokompleksima koji se talože u tkiva, posebice u stijenke krvnih žila dovodeći do oštećenja, a također dolazi do novačenja i aktivacije leukocita s pomoću komplementa i Fc receptora. Tip IV preosjetljivosti potpomognut je limfocitima T koji potiču upalu ili izravno ubijaju ciljane stanice. Taj je tip preosjetljivosti uglavnom prouzročen aktivacijom pomagačkih CD4+ T-stanica koje izlučuju citokine odgovorne za razvoj upale i aktivaciju leukocita. Pomagačke T-stanice također potiču proizvodnju protutijela koja oštećuju tkiva. (Abbas i sur; 2018)

Alergije su bolesti prouzročene imunosnim reakcijama na nemikrobne antigene iz okoliša u kojima sudjeluju mastociti, eozinofili, imunoglobulin E (IgE) i pomagačke T-stanice koje stvaraju IL-4, IL-5 i IL-13. U tim reakcijama aktivirani mastociti i eozinofili brzo oslobađaju medijatore koji prouzročuju povećanu propusnost krvnih žila, vazodilataciju i kontrakciju glatkih mišića bronha i drugih organa. Alergije se nazivaju i neposrednom preosjetljivošću jer započinju brzo, unutar nekoliko minuta nakon izlaganja antigenu. Antigeni koji potiču nastanak neposredne preosjetljivosti nazivaju se alergeni. Većina ih potječe od proteina iz okoliša te

produkata životinja i kemijskih tvari koje mogu preinačiti vlastite proteine. Iako naziv „atopija“ izvorno znači neuobičajen, danas znamo da je alergija najčešći poremećaj imunskog sustava koji zahvaća gotovo 20 % populacije SAD-a i Europe s povećanjem prevalencije u cijelom svijetu. Glavno je obilježje alergijskih bolesti stvaranje protutijela IgE koje je ovisno o aktivaciji pomagačkih T- stanica. Tipičan slijed događanja u neposrednoj preosjetljivosti sastoji se od izlaganja antigenu, aktivacije limfocita koji su specifični za antigen (Th2), proizvodnje protutijela IgE, vezanja protutijela na Fc receptore na mastocitima te aktivacije mastocita nakon ponovljenog izlaganja antigenu koja dovodi do oslobađanja medijatora iz mastocita i posljedične patološke reakcije. Klinička i patološka očitovanja alergije posljedica su reakcije glatkih mišića i krvnih žila neposredno nakon ponovljenog izlaganja alergenu te nakon odgođene kasne faze upalne reakcije. Ovisno o zahvaćenom tkivu, alergijske se reakcije očituju na različite načine, kao što su začepljenje sinusa, osip na koži, suženje bronha, bolovi u trbuhu, proljev i sistemski šok. Najekstremniji sistemski oblik naziva se anafilaksija, a kod nje medijatori mastocitnog podrijetla sužavaju dišne putove, što može dovesti i do gušenja i prouzročiti kolaps kardiovaskularnog sustava koji može dovesti do smrti. (Abbas i sur; 2018)

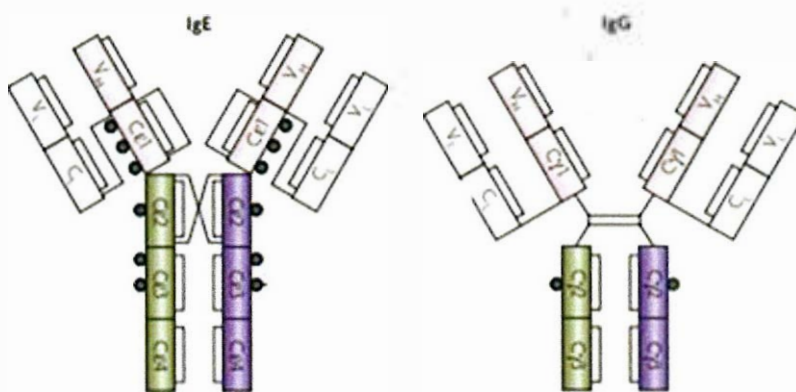


Slika 1. Slijed zbivanja u alergijskim reakcijama  
(<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/hypersensitivities/>)

### 1.1.1. Antitijela

Imunoglobulin E najmanje je zastupljen razred antitijela u serumu i može se izmjeriti samo vrlo osjetljivim imunološkim metodama. Ne prolazi kroz posteljicu, a njegova proizvodnja počinje već u rano fetalno doba. IgE dijeli istu osnovnu molekularnu arhitekturu kao antitijela drugih klasa, s dvama identičnim teškim lancima i dvama identičnim lakim lancima, ali teški  $\epsilon$ -lanac sadržava jednu domenu više od teškog  $\gamma$ -lanca IgG. Par C $\epsilon$ 3 i C $\epsilon$ 4 domena slijedom je homologan, a sličan je i po kvarternoj strukturi paru C $\gamma$ 2 i C $\gamma$ 3 domena IgG. Par C $\epsilon$ 2 domena, smješten u ekvivalentnom položaju koji zauzima fleksibilno zglobno područje IgG, najočitija je distinktivna značajka IgE. Taj termolabilni razred imunoglobulina čine reagini, antitijela koja posreduju u atopičnim alergijskim reakcijama. Ona imaju svojstvo homocitotropnosti, tj. svojim ulomkom Fc čvrsto se vežu za receptore Fc $\epsilon$ R na površini mastocita i bazofilnih leukocita, a uz njih to mogu biti i eozinofilni leukociti te trombociti. Vezanje antigena (alergena) izaziva degranulaciju mastocita i oslobađanje farmakoloških medijatora anafilaksije. Pri infestaciji parazitima, posebno helmintima, raste količina IgE u serumu i to pomaže u izbacivanju nametnika. Antitijela koja su odgovorna za anafilaktičku preosjetljivost pripadaju razredu IgE, a često ih nazivamo reaginima. Serumna koncentracija IgE u većine ljudi vrlo je mala (0,1 do 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a povećava se samo pri infestaciji parazitima. No, u ljudi sklonih anafilaktičkom načinu reagiranja koncentracija IgE povećava se i pri dodiru s različitim drugim antigenima (alergenima). Za stvaranje takvih antitijela nakon prvog dodira s alergenom i za njihovo vezanje za ciljne stanice treba oko 14 dana; to razdoblje nazivamo razdobljem senzibilizacije. Unesemo li tada ponovno alergen u organizam, nastat će reakcija alergena s antitijelima vezanim za ciljne stanice. Konačni učinak te reakcije bit će oslobađanje različitih medijatora. Mastociti i bazofili imaju na svojoj površini receptore za ulomak Fc na IgE, nazvane Fc $\epsilon$ RI. To su receptori velikog infiniteta, a građeni su od četiri polipeptidna lanca. Da bi se oslobodili medijatori iz ciljnih stanica, jedna molekula alergena mora reagirati s dvjema molekulama antitijela IgE i tako ih premostiti. Reagiranjem antitijela IgE s alergenom nastaje agregacija receptora Fc $\epsilon$ RI, čime počinje slijed složenih unutarstaničnih zbivanja. Posljedice tih zbivanja jesu degranulacija i oslobađanje medijatora koji su već pohranjeni u zrcima, sinteza i izlučivanje lipidnih medijatora te sinteza i izlučivanje citokina. (Gould i Sutton, 2008) (Andreis i sur; 2010)





Slika 2. Građa IgE antitijela (Gould i Sutton, 2008.)

### 1.1.2. Alergeni

Alergeni su proteini ili kemijske tvari vezane za proteine koji izazivaju reakcije neposredne preosjetljivosti. Tipični su alergeni proteini peluda, kućne grinje, perut životinja, hrana i kemijske tvari poput antibiotika (penicilina). Dva su važna obilježja alergena. Prvo, pojedinci su opetovano izloženi djelovanju alergena i drugo, za razliku od mikroorganizama, alergeni općenito ne potiču urođene imunosne odgovore u kojima makrofagi i dendritne stanice oslobađaju citokine nužne za razvoj Th1 i Th17 stanica. Preosjetljivost na neki antigen može proizlaziti i iz njegove kemijske naravi. Postoje neke značajke koje su karakteristične za većinu uobičajenih alergena. One uključuju malu do srednju molekularnu masu (5 – 70 kD), postojanost, glikozilaciju i veliku topljivost u tjelesnim tekućinama. Primjerice, anafilaktičke odgovore na hranu prouzročuju jako glikozilirani mali proteini. Te strukturne značajke vjerojatno štite alergene od denaturacije i razgradnje u probavnom sustavu i omogućuju im da se apsorbiraju u nepromijenjenom obliku. Mnogi su alergeni enzimi, kao što su cisteinska proteaza iz kućne grinje *Dermatophagoides pteronyssinus* i fosfolipaza A iz pčelinjeg otrova. Da bi se razvila alergijska reakcija na neki antigen potrebno je ponovno izlaganje tom antigenu jer su preduvjet za razvoj reakcije preosjetljivosti prekapćanje na izotip IgE i senzibilizacija mastocita IgE antitijelima. Primjer za to jest pčelinji ubod. Proteini u otrovu insekata obično ne stvaraju problem pri prvom kontaktu budući da atopična osoba još nema specifična IgE protutijela. No, već kod drugog uboda insekta može doći do smrtonosne anafilaksije jer je moguće da su se pri prvom kontaktu s antigenom stvorila IgE protutijela. (Abbas i sur; 2018)



### 1.1.3 Alergijske manifestacije

Osobe s atopijom mogu imati jednu ili više manifestacija alergijske bolesti. Najčešći su oblici alergijski rinitis (peludna hunjavica), bronhna astma, atopijski dermatitis (ekcem) i alergije na hranu. Mjesto dodira s alergenom može odrediti koji će organi ili tkivo biti zahvaćeni. Primjerice, antigeni uneseni hranom prouzrokuju povraćanje i proljev, udahnuti antigeni prouzrokuju rinitis ili astmu, a injicirani antigeni imaju sistemske učinke na cirkulaciju. (Abbas i sur; 2018)

Kod sistemske anafilaksije dolazi do sniženja krvnog tlaka kao posljedice sistemske vazodilatacije i edema u mnogim tkivima. Standardno liječenje anafilaktičkog šoka obuhvaća sistemsko davanje adrenalina koji može spasiti život poništavajući bronhokonstriktorske i vazodilatacijske učinke medijatora mastocita. U njezinu liječenju mogu biti korisni i antihistaminici. (Abbas i sur; 2018)

### 1.1.4 Liječenje

Što se tiče samog liječenja alergijskih reakcija, ono ovisi o manifestaciji. Lijekovi koji se najčešće koriste za liječenje alergijskog rinitisa jesu antihistaminici. Oni su kompetitivni antagonisti H1 receptora. Postoje dvije skupine, odnosno antihistaminici prve i druge generacije. Te dvije glavne skupine razlikuju se po relativno jakim sedacijskim učincima većine lijekova prve generacije. Najčešće korišteni antihistaminici za terapiju alergija jesu oni druge generacije, konkretno loratidin ili cetirizin. Također se ista terapija koristi i kod urtikarije. Astma se danas liječi usredotočenjem na sprječavanje i prekidanje upale te opuštanje glatkih mišića dišnih putova. Posljednjih godina liječenje je usmjereno na protuupalne lijekove kao primaran način liječenja. Osim njih, koriste se inhalacijski kortikosteroidi koji sprječavaju stvaranje upalnih citokina. Njihov je najvažniji učinak inhibicija infiltracije dišnih putova limfocitima, eozinofilima i mastocitima. Liječenje aerosolom najučinkovitiji je put liječenja da bi se izbjegli štetni učinci kortikosteroidne terapije. Uvođenje kortikosteroida kao što su beklometazon, budesonid, ciklesonid, flunisolid, flutikazon itd. omogućilo je isporuku kortikosteroida u dišne putove uz minimalnu sistemsku apsorpciju. Poseban problem koji prouzrokuju inhalacijski kortikosteroidi jest orofaringealna kandidijaza. Rizik od ove komplikacije može se smanjiti ispiranjem grla vodom. Opuštanje glatkih mišića bronha postiže se lijekovima koji povećavaju razinu unutarstaničnoga cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP-a), čime se sprječava kontrakcija. Najčešće korišteni lijekovi iz te skupine aktivatori su adenilat-ciklaze čiji su učinci

potpomognuti vezanjem na  $\beta_2$ -adrenergične receptori ( $\beta_2$  agonisti). Danas se najčešće rabe  $\beta_2$  - selektivni agonisti. To su salbutamol, terbutalin, metoproterenol i pirbuterol, koji se mogu primjenjivati s pomoću inhalatora. Koriste se i inhibitori leukotriena koji sprječavaju vezanje bronhokonstriktorskih leukotriena na stanice glatkih mišića. Dva su pristupa u antagoniziranju učinka leukotriena: inhibicija 5-lipoksigenaze s posljedičnim sprječavanjem sinteze leukotriena i inhibicija vezivanja LTD<sub>4</sub> za receptore na ciljnim tkivima. Učinkovitost u blokadi odgovora dišnih putova na fizički napor i na izlaganje antigenu pokazana je za lijekove obaju skupina: zileuton, zafirlukast i montelukast. Glavna im je prednost oralna primjena. Jedna od novo-prihvaćenih metoda liječenja jest i primjena ljudskih monoklonskih antitijela anti-IgE koja učinkovito smanjuje serumsku razinu IgE. Atopijski dermatitis primarno se može liječiti kortikosteroidima koji sprječavaju sintezu citokina i time djeluju na upalnu reakciju kasne faze. Danas se pokušavaju uvesti liječenja koja bi ograničila početak alergijskih reakcija postupcima kojima se u bolesnika nastoji promijeniti imunosni odgovor specifičan za alergen. Jedan od tih postupaka se zove hiposenzibilizacija, u kojem se pod kožu opetovano unose male količine antigena. Taj postupak smanjuje razinu specifičnog protutijela IgE, dok često zna rasti titar IgG protutijela, čime se vjerojatno dodatno sprječava stvaranje IgE. Ovaj je pristup bio učinkovit u sprječavanju akutne anafilaktičke reakcije na proteinske antigene (npr. otrov kukaca) ili važne lijekove (npr. penicilin). Napredak molekularne biologije u sprezi s farmaceutskom industrijom omogućio je i pristup u kojem je ciljna molekula IgE. Omalizumab je monoklonsko protu-IgE antitijelo koje inhibira vezivanje IgE za mastocite, a ne aktivira IgE već vezane za ove stanice te stoga ne prouzročuje degranulaciju mastocita. (Abbas i sur; 2018) (Katzung i sur; 2011)

#### 1.1.5. Dijagnosticiranje

Od 50-ih godina 20. stoljeća „skin prick test” (kožni ubodni test, SPT) bila je najčešće korištena kožna metoda za ispitivanje alergija na hranu. Epikutana SPT tehnika uključuje primjenu male količine ekstrakta alergena i naknadno ili istodobno beskrvno bockanje kože, ovisno o uređaju koji se koristi. Izloženost relevantnih antigena kožnim mastocitima umrežava njihov površinski IgE i prouzročuje degranulaciju. Rezultirajuća lokalna upalna reakcija može se mjeriti kao surogat senzibilizacije na hranu. Lokalna primjena histamina služi kao pozitivna kontrola, a normalna fiziološka otopina kao negativna. Pouzdani i široko dostupni testovi *in vitro* za specifični IgE (sIgE) na alergene uvedeni su 90-ih godina prošlog stoljeća. Prvi komercijalno dostupan test, radioalergosorbentni test, u velikoj je mjeri zamijenjen sIgE imunoenzimskim

testovima kao što je, primjerice, ispitivanje ImmunoCAP (Phadia, ThermoFisher Scientific, Uppsala, Švedska), u kojem se serumska antitijela vežu na alergen i kvantificiraju enzimski obilježenim anti-IgE antitijelom. Zlatni standard za dijagnozu alergije na hranu jest „oral food challenge“ (OFC; oralno testiranje hranom), metoda koja sadržava alergen koji izaziva ponovljive kliničke simptome. Bilo da su otvoreni ili kontrolirani placebom, OFC se može izvoditi isključivo u ambulantnim uvjetima uz pomno kliničko promatranje koje provodi osoblje osposobljeno za upravljanje potencijalnim reakcijama, uključujući anafilaksiju. U OFC-u potencijalno alergena hrana unosi se u unaprijed definiranim, postupno povećavajućim dozama dok se ne unese cijela planirana količina. Objektivni simptomi, poput osipa, oteklina, povraćanja i piskanja potvrđuju alergiju potpomognutu imunoglobulinom E (IgE). Određivanje koncentracije ukupnog IgE koristi se za određivanje mehanizma alergijske reakcije te praćenje uspješnosti liječenja. (LaHood i Patil, 2019)

Danas je određivanje koncentracije ukupnog IgE (tIgE), kao jednostavna i automatizirana metoda, sastavni dio postupka probira za osobe s atopijom. Nakon toga slijedi postupak identifikacije alergena koji su pokrenuli alergijsku reakciju određivanjem specifičnog IgE u odnosu na moguće uzročne alergene na što su uputili SPT, anamneza i klinička slika pacijenta. Određivanje koncentracije sIgE tijekom nekoliko godina podrazumijevalo je identifikaciju sIgE s pomoću alergenijskih ekstraktnih materijala dobivenih iz prirodnih izvora alergena. Metode za određivanje koncentracije sIgE s pomoću alergenskog ekstrakta najčešće se koriste jer se dobiva podatak koji je izvor uzroka senzibilizacije i velike su dijagnostičke osjetljivosti, a rezultati se izražavaju kvantitativno i kao sIgE razredi. (Dodig i Čepelak, 2018)

Poznavanje broja eozinofilnih granulocita također može pomoći u prosuđivanju trenutne izloženosti alergenu jer su alergijske bolesti obično praćene umjerenom eozinofilijom. Određuje se i eozinofilni kationski protein (ECP). To je heterogena skupina molekula koja se nalazi u specifičnim granulama eozinofilnih granulocita te u manjoj količini u neutrofilnim granulocitima i monocitima. Izlučuje se iz tkivnih eozinofila nakon imunoglobulinima ili komplementom potpomognute aktivacije stanica. Određuje se imunokemijskim metodama u dva koraka. Na temelju koncentracije ECP može se procijeniti težina bolesti i odrediti terapija. (Topić i sur; 2017)

Jedna od bitnih metoda uključuje i određivanje osjetljivosti na rekombinantne alergene. Rekombinantni alergeni podrazumijevaju pojedinačne alergenske molekule proizvedene složenim biotehničkim postupcima kloniranja u bakteriji *Escherichia coli*. Prema strukturnim i funkcionalnim karakteristikama odgovaraju prirodnim glavnim i križno-reaktivnim

alergenima, odnosno komponentama pojedinih alergenskih izvora (inhalacijskih i nutritivnih alergena, alergena otrova opnokrilaca, plijesni, lateksa). Zasad se koriste pri određivanju koncentracije specifičnoga IgE prema alergenskim komponentama odnosno pojedinačnim alergeničnim molekulama. Određivanje koncentracije sIgE-a prema pojedinačnim alergeničnim molekulama, bilo pročišćenim prirodnim molekulama ili rekombinantnim molekulama, omogućilo je razlikovanje glavnih alergeničnih molekula od onih sporednih, odnosno križno-reaktivnih molekula nekog alergena. Određivanje sIgE-a može se provoditi kao pojedinačan test (jedan uzorak – jedna molekula, engl. *singleplex*) ili kao istodobno određivanje većeg broja molekula (engl. *multiplex*) na mikropostroju (engl. *microarray*). (Dodig, 2017)

#### 1.1.6 Križna reaktivnost

Križna reaktivnost (CR) pojavljuje se kada adaptivni imunski odgovor na određeni antigen prouzrokuje reaktivnost na druge antigene koji su strukturno povezani s induktorom. CR je prednost u obrani od infekcija, ali ima negativne učinke kod nekih imunskih poremećaja, od kojih su najistaknutiji autoimune bolesti i alergijski poremećaji kod kojih može utjecati i na dijagnozu i na liječenje. Reakcija antigen – antitijelo temelji se na prostornoj komplementarnosti epitopa s idiotopom. Epitopi, koji se sastoje od ulomaka od 5 do 7 aminokiselina, mogu biti linearni ili konformacijski, premda su konformacijski češći i promjenjivi. Koncept homologije temelji se na činjenici da sličnost u sekvencama uočenim između molekula proizlazi iz njihova zajedničkog podrijetla. Oni stoga imaju istu funkciju i zato moraju očuvati isto ukupno preklapanje. Smjernice Svjetske zdravstvene organizacije za predviđanje alergnosti preciziraju da se može smatrati da protein može sudjelovati u križnoj reakciji s alergenom ako dijele najmanje 35 % sličnosti sekvence u ulomku od 80 aminokiselina ili ako imaju u potpunosti isti peptid od 6 – 8 aminokiselina iz alergena. Međutim, s obzirom na to da je za aktiviranje mastocita i bazofila potrebno da IgE antitijela vezana na receptore tih stanica prepoznaju više od dva epitopa s visokim afinitetom, CR između IgE i efektorskih stanica malo je vjerojatna ako je sekvencijska sličnost manja od 70 %. Stoga je CR imunološka pojava čije je kliničko očitovanje – kad se to dogodi – povezanost dvaju ili više alergija. CR sindromi opisani su između filogenetski bliskih vrsta, kod kojih se čini da što je kraća taksonomska udaljenost, to je veća vjerojatnost nastanka CR. Međutim, CR je također opisana između filogenetski udaljenih vrsta. U tim su slučajevima odgovorni alergeni obično homologni proteini koji pripadaju specifičnim skupovima molekula. Reakciju često prouzrokuju proteini



koji su visoko očuvani s evolucijskog gledišta i koji su, s obzirom na njihovu široku prisutnost, nazvani panalergenima. (García i Lizaso, 2011)

Najčešći alergeni križnih reakcija jesu PR-10, nespecifični protein za prijenos lipida (LTP), lipokalin, profilin, tropomiozin.

PR-10 pripada u skupinu proteina povezanih s patogeneom (eng. *pathogenesis related protein*, PR). Oni su sastojci urođenog imunskog sustava u biljkama i igraju važnu ulogu u obrani biljaka od patogena. To su višefunkcijski mali proteini koji sudjeluju u odgovoru biljaka na abiotski i biotski stres. Mnogi su pripadnici skupova PR-10 i PR-14 sveprisutni biljni panalergeni koji mogu izazvati senzibilizaciju ljudskoga imunskog sustava i unakrižne reaktivne alergijske reakcije na biljnu hranu i pelud, uključujući homologe glavnoga peludnog alergena Bet v 1 bijele breze. Bet v 1 homolozi najzanimljiviji su predstavnici podskupa PR-10 zbog svoje kliničke važnosti kao biljni alergeni. Profilini i PR-10 proteini imaju veliku križnu reaktivnost. (Finkina i sur; 2017)

Nespecifični protein za prijenos lipida (LTP) daleko je najčešći uzrok primarne alergije na hranu u odraslih koji žive na Mediteranskom području gdje također prouzročuje najveći broj o hrani ovisnih anafilaktičkih reakcija. LTP su, kao i PR-10, višefunkcijski mali proteini koji sudjeluju u imunskoj obrani biljaka. LTP-ovi su otporni i na termičku obradu i na probavu pepsinom što im omogućuje da dođu do crijevnog trakta u nemodificiranom obliku, što je važan uvjet za izazivanje sustavnih reakcija. (Finkina i sur; 2017)

Većina važnih respiracijskih alergena izvedenih iz sisavaca, kao i alergeni iz mlijeka i nekoliko alergena povezanih s insektima, pripadaju skupu proteina lipokalina. Kako se alergeni lipokalina sisavaca nalaze u peruti, slini i mokraći, oni se učinkovito raspršuju i široko su prisutni u zatvorenom okruženju. U početku su lipokalini karakterizirani kao transportni proteini za male, uglavnom hidrofobne molekule, no sada je poznato da sudjeluju u mnogim drugim biološkim funkcijama. Oni induciraju proizvodnju IgE u velikom dijelu atopičnih osoba izloženih izvoru alergena. (Virtanen i sur; 2012)

Profilin je protein koji je prisutan u svim eukariotskim stanicama i odgovoran je za križnu reaktivnost između peludi, lateksa i biljne hrane. Iako je prisutan u svim peludima i povrću, profilin je bitno povezan s alergijom na pelud trave i plodove porodice *Cucurbitaceae*. Heb v 8, lateks profilin, obično je biljeg alergije na profilin u bolesnika s alergijom na biljnu hranu, iako nema kliničko značenje kod alergije na lateks. (Rodríguez i sur; 2018)

Tropomiozin je glavni alergen u školjkaša i odgovoran je za unakrižnu reaktivnost između školjaka i drugih beskičmenjaka. Štoviše, tropomiozin je identificiran kao panalergen mnogih vrsta beskralježnjaka, uključujući ostale rakove (jastog, rak), mekušce (školjke, ostrige, kapice, hobotnice, lignje, puževe, abalone, školjke), zohare i grinje. Tropomiozini su prisutni i u mišićnim i nemišićnim stanicama. U prugastim mišićima potpomažu u interakciji kompleksa troponin-aktin radi regulacije kontrakcije. (Faber i sur; 2017)

## 1.2. Atopijski dermatitis

Atopijski dermatitis, ekcem, (AD) dio je atopijske trijade (atopijski dermatitis, alergijski rinitis i astma), ali se može pojaviti i samostalno. To je čest kožni poremećaj koji može biti prouzročen reakcijom kasne faze na alergen u koži. U toj kožnoj reakciji kasne faze faktor nekroze tumora (TNF), interleukin 4 (IL-4) i drugi citokini, koji vjerojatno potječu iz Th2 stanica i mastocita, djeluju na endotelne stanice kako bi ubrzali upalu. Djeca s genetičkim promjenama u zaštitnoj funkciji kože, nastalima zbog mutacije u genu koji kodira filagrin, vrlo su podložna razvoju atopijskog dermatitisa. Filagrin (FLG), iz "FILament AGgregating pRoteIN", strukturni je epidermalni protein iz *stratum corneum* (SC) koji veže kalcij. Veže intermedijarnu nit keratina koja stvara mikrofibrile i odgovoran je za normalnu funkciju SC. Da bi se održala zaštitna funkcija kožne barijere, posebno održavanje pH, hidratacije i antimikrobnih funkcija, potreban je filagrin. On je i višenamjenski, netopivi protein bogat histidinom. U brojnim studijama koje su pratile otkriće mutacije gena FLG, oštećenje epidermalne barijere, uključujući nedostatak FLG-a, smatrao se primarnim patogenim mehanizmom pokretanja AD-a. Prema Thyssen i sur. važna zapažanja koja stavljaju FLG u središte patogeneze AD-a jesu: poremećene vrijednosti FLG-a u koži s lezijama ili bez njih u bolesnika s AD-om, činjenica da približno 50 % bolesnika s umjerenom ili teškom AD-om ima barem jednu FLG mutaciju, da smanjenje broja kopija FLG-a povećava rizik od AD-a, da su smanjene vrijednosti FLG-a dokazane na lezijama kože unatoč odsutnosti FLG mutacija i da neke od postojećih terapija mogu popraviti vrijednosti FLG-a. (Thyssen i Kezić, 2014) (Abbas i sur; 2018)





Slika 3. Prikaz atopijskog dermatitisa (<https://www.the-dermatologist.com/news/atopic-dermatitis-linked-high-disease-burden>)

Ovo pruritičko kronično upalno stanje kože pogađa 10 – 12 % dječje populacije. Alergijska respiracijska bolest razvit će se u 50 – 80 % bolesnika s AD-om kasnije u životu. Alergije na hranu u snažnoj su korelaciji s razvojem i trajanjem AD-a, posebno tijekom dojenačkog doba i ranog djetinjstva. Koža je mjesto koje je najčešće uključeno u reakcije preosjetljivosti na hranu, s pruritusom kao najdosljednijim znakom. Izgleda da odgođene reakcije na hranu igraju ulogu u pogoršanjima AD-a kod nekih bolesnika. „Oral Food Challenges„(OFC) („oralni prehrambeni izazovi“) bili su korišteni za ispitivanje mogu li alergeni u hrani izazvati simptome pruritičkog tipa osipa u djece s alergijom na hranu i AD-om. OFC je zlatni standard za dijagnozu alergije na hranu u ispitanika s AD-om. U istraživanju Mavroudi A i sur. djeca s atopijskim dermatitisom ispitivana su zbog klinički aktivne alergije na hranu. Većina senzibilizacije na hranu odnosila se na mlijeko (80 %), a manji postotak senzibilizacije na jaja (55 %), pšenicu (20 %), bakalar i soju (2,5 %). Zaključno, alergija na hranu dijagnosticirana je jednom od četvero djece u ispitivanoj skupini s AD-om bez obzira na težinu bolesti, dok utvrđena senzibilizacija iznosi 44,31 %. Visok ukupan serumski IgE i periferna eozinofilija prepoznati su u približno 80 % i 25 % uzorka pacijenata, bez obzira na težinu bolesti i senzibilizaciju na hranu. (Mavroudi i sur; 2016)

Atopijski dermatitis obično započinje prije pete godine života i slijedi recidivno-remitentno razdoblje koje se većinom spontano poboljšava do adolescencije. Više od 80 % djece s AD-om pati od blage bolesti. Alergije na hranu (FA) u porastu su u cijelom svijetu, s procjenom prevalencije u djetinjstvu u razvijenom svijetu od 3 do 10 %. FA imaju znatan utjecaj na ukupnu kvalitetu života iako je smrtnost povezana s FA-om niska. FA i AD utječu na oba spola, s blagom muškom prevlašću. Nefunkcionalna epidermalna barijera obilježje je AD-a. Čimbenici poput mutacija filagrina, niske vlažnosti i kožne neravnoteže citokina prouzročuju smanjenje izražaja filagrina što utječe na nekoliko putova važnih za funkciju epidermalne barijere. Neispravna kožna barijera omogućuje prodiranje alergena, iritansa i mikroorganizama koji zatim stupaju u interakciju s imunim sustavom. AD je povezan s aktiviranim podskupinama T-stanica, ponajprije TH2, ali sve se više prepoznaju uloge citokinskih putova Th22, Th17 i Th1. Odgovor Th2 karakterizira prekomjerna proizvodnja IL4, interleukina 5 (IL5), interleukina 13 (IL13); to dovodi do povećane proizvodnje IgE i periferne eozinofilije. Disfunkcije epidermalne barijere i upala kože uzajamne su aktivnosti u patogenezi AD-a i obje rezultiraju „ciklusom svrbeža i ogrebotina“. AD u male djece snažan je čimbenik rizika alergiju na hranu potpomognutu s IgE: u novorođenčadi s AD-om šest je puta veća vjerojatnost da će imati alergiju na jaja, a 11 puta veća vjerojatnost da će imati alergiju na kikiriki do 12. mjeseca života nego dojenčad bez ekcema. Funkcija kožne barijere važna je u razvoju i trajanju FA: mutacije gubitka funkcije filagrina povezane su s FA u djetinjstvu i adolescenciji. Ukratko, FA je čest u djece s umjerenim do teškim AD-om. (Cartledge i Chan, 2018)

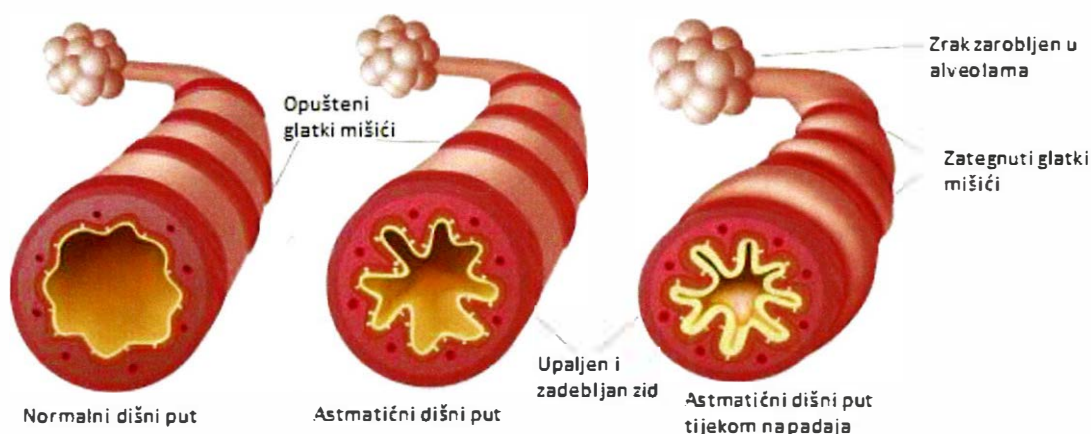
U istraživanju koje su napravili Dhama S. i Sheikh A. podaci su uzeti za 1 618 877 djece. Od toga je 4331 (25,7 %) djece do 17 godina imalo zabilježenu dijagnozu atopijskog ekcema / dermatitisa, a 1316 (7,8 %) imalo je indikaciju trenutnog umjerenog do teškoga atopijskog ekcema / dermatitisa. Od toga je razmatrano 157 djece. Klinička procjena otkrila je da 130/157 (82,8 %) nije imalo indikaciju da alergija potpomognuta IgE-om doprinosi njihovom atopijskom ekcemu / dermatitisu; preostalih 27/157 (17,2 %) klinički je procijenjeno kao podložno IgE-om potpomognutom atopijskom ekcemu / dermatitisu i traženi su odgovarajući testovi za daljnje istraživanje. Na temelju detaljne kliničke procjene alergija se smatrala doprinosnim čimbenikom u otprilike 20 % djece s trenutnim umjerenim do teškim atopijskim ekcemom / dermatitisom, a otprilike polovina ove djece pozitivno je reagirala na hranu i/ili aeroalergene. (Dhama i Sheikh, 2015)

Dobro je poznato da hrana, inhalacijski i kontakti alergeni doprinose pogoršanju ekcema u bolesnika s AD-om. Kravlje mlijeko i kokošja jaja mogu izazvati naglu upalu kod novorođenčadi i male djece s AD-om, dok su inhalacijski alergeni i kontakti alergeni od veće važnosti kod starije djece, adolescenata i odraslih. Godine 1949. Tuft je otkrio da većina odraslih pacijenata s AD-om ima pozitivne kožne testove na „autolognu“ kućnu prašinu. Također je primijetio da udisana prašina može prouzročiti pogoršanje kožnih simptoma, što je zatim poboljšano češćim čišćenjem kuće. Walker je primijetio da se kod nekoliko njegovih pacijenata AD pogoršao nakon izlaganja konjskoj peruti, travi mačji repak (*Phleum partense*) ili peludi ambrozije. Tuft i suradnici izvijestili su da se u bolesnika s AD-om, pruritusom i ekcematoidnim lezijama kože pogoršalo stanje nakon intranazalnog udisanja peludi *Alternaria spp.* ili peludi ambrozije. Schafer je izvijestio da je stupanj senzibilizacije na aeroalergene izravno povezan s ozbiljnošću AD-a. U većine bolesnika s AD-om IgE antitijela na specifični inhalacijski alergen bila su zabilježena godinama. Najveća koncentracija IgE u bolesnika s AD-om specifična je za grinje. Nedavno istraživanje otkrilo je da je 95 % seruma pacijenata s AD-om imalo IgE na grinje u prašini, u usporedbi s 42 % astmatičara. Štoviše, koncentracije IgE na alergene iz grinja u pacijenata s AD-om obično su bile najmanje 20 puta veće od koncentracija pacijenata s astmom. Čak i u bolesnika s „čistim“ AD-om vrlo visoke razine IgE nisu bile rijetkost. Međutim, još uvijek postoji prijepor o povezanosti ozbiljnosti razine IgE u pacijenata s AD-om. (Dai, 2007)

### 1.3. Astma

Astma je upalna bolest prouzročena ponavljajućom reakcijom neposredne preosjetljivosti i alergijskom reakcijom kasne faze u plućima koja prouzročuju razvoj kliničko patološke trijade koju čine povremena i reverzibilna opstrukcija dišnih putova, kronična upala bronha s infiltracijom eozinofilima te hipertrofija glatkih mišićnih stanica bronha s pojačanom reakcijom na bronhokonstriktore. Bolesnici pate od naglih ponavljanih napada bronhokonstrikcije i povećanog stvaranja guste sluzi, što dovodi do začepjenja bronha i otežanog disanja. Astma se često pojavljuje zajedno s kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti. Ona pogađa približno 20 milijuna ljudi u SAD-u, a njezina učestalost znatno raste posljednjih godina. Prevalencija je slična i u drugim razvijenim zemljama, ali u manje razvijenim dijelovima svijeta može biti niža. U približno 70 % slučajeva astma je povezana s reakcijama potpomognutima IgE protutijelima koja su odraz atopije. Patofiziološki slijed u atopijskoj astmi vjerojatno započinje aktivacijom

mastocita u odgovoru na vezanje alergena na IgE i odgovorom Th2 stanica na alergene. Lipidni medijatori i citokini koji su stvoreni u mastocitima i T-stanicama dovode do nakupljanja eozinofila, bazofila i još većeg nakupljanja Th2 stanica. Smatra se da su pojačana reaktivnost i hipertrofija glatkih mišićnih stanica posljedica djelovanja medijatora i citokina leukocitnog podrijetla. Bazofili, eozinofili i mastociti stvaraju medijatore koji potiču kontrakciju glatkih mišića dišnih putova. Najvažniji medijatori koji prouzrokuju bronhokonstrikciju jesu leukotrien C4 (LTC<sub>4</sub>), leukotrien D4 (LTD<sub>4</sub>) i leukotrien E4 (LTE<sub>4</sub>). Posljedica djelovanja citokina, uglavnom IL-13, na epitelne stanice bronha povećano je lučenje sluzi. (Abbas i sur; 2018)



Slika 4. Morfologija dišnog puta kod astmatičara i zdrave osobe (<http://asthma99.com/asthma.html>)

U osjetljivih osoba ova upala prouzročuje ponavljajuće epizode „zviždajućeg daha“, stezanja u prsima i kašlja, posebno noću ili rano ujutro. Te su epizode obično povezane s raširenom, ali promjenljivom opstrukcijom protoka zraka koja je često reverzibilna, bilo spontano bilo tijekom liječenja. Upala također prouzročuje pridruženi porast postojeće bronhne hiperreaktivnosti na razne podražaje. Reverzibilnost ograničenja protoka zraka može biti nepotpuna kod nekih pacijenata s astmom. Istraživanja potvrđuju da postoje genetičke predispozicije za pojavu astme te da se ona nasljeđuje u 35 – 95 % slučajeva.. Atopijski uvjeti i senzibilizacija na inhalacijske alergene također su povezani s razvojem astme. Upala u donjem dišnom putu najvjerojatnije proizlazi iz kombinacije genetičke predispozicije, izloženosti okolišu i mogućih promjena mikrobioma i metabolita (molekule male molekulske mase u biološkim sustavima). Upala bronha dovodi do povećane proizvodnje sluzi, povećane bronhokonstrikcije i suženja dišnih putova zbog submukozne hipertrofije glatkih mišića i taloženja kolagena iz izvanstaničnog matriksa. Astma je često epizodna, s nizom okolišnih



pokretača koji se razlikuju među astmatičarima. Okidači uključuju viruse, alergene, iritante (dim), vježbanje i temperaturne promjene. Upala prouzrokuje začepljenje ponajprije bronhnih dišnih putova sa simptomima otežanog disanja, piskanja, stezanja u prsima i kašlja. Reverzibilnost često pomaže razlikovanju astme od ostalih plućnih stanja. (Mims, 2015)

Teška astma u djece povezana je sa znatnim poboljšanjem i padom plućne funkcije. Ona je vrlo heterogen poremećaj s više kliničkih fenotipova. Nekoliko popratnih bolesti može pridonijeti pogoršanju kontrole astme i zakomplicirati dijagnostičko i terapijsko upravljanje teškim astmatičarima. Senzibilizacija alergenima i/ili simptomi alergije mogu predvidjeti početak i težinu astme. Atopijska senzitivizacija dobro je uspostavljen, ali ne i isključivi čimbenik rizika za tešku astmu i kod djece i kod odraslih u cijelom svijetu. Iako se posljednjih godina njegova uloga u određivanju težine astme smatrala ograničenom, neka izvješća potvrđuju da alergija može igrati važnu ulogu, posebno u djetinjstvu kada je rana atopijska senzitivizacija presudna za određivanje težine bolesti. Iako većina astmatične djece kontrolu simptoma postiže povremenom upotrebom bronhodilatatora (BD) ili malom do srednjom dozom inhalacijskih kortikosteroida (ICS), mali, ali važan podskup bolesnika ostaje s nekontroliranom astmom unatoč liječenju visokim dozama inhaliranih glukokortikoida ili im je potrebno takvo liječenje da stanje ostane dobro kontrolirano. Ova skupina djece s kroničnim simptomima i epizodnim pogoršanjem kojima su potrebni kratkotrajni beta2-agonisti (SABA) definira se kao pogođena „astmom koja se teško liječi“. Respiracijski simptomi kao kliničko očitovanje IgE potpomognute alergije na hranu obično se javljaju odmah nakon izlaganja određenoj hrani i popraćeni su kožnim i/ili gastrointestinalnim manifestacijama. Među bolesnicima s FA astmatični simptomi češći su u djece, a posebno u one s istodobnim atopijskim dermatitisom. Uz respiracijske simptome koji se javljaju kao pojava FA, pacijenti s FA imaju povećani rizik za razvoj astme i često teške astme kao izraz nadiranja bolesti. (Arasi i sur; 2019)

U usporedbi s djetetom koje nije astmatičar, dijete s astmom ima 14 puta veći rizik od razvoja teške alergijske reakcije na uzimanje neke hrane. Najčešće citirana hrana jest voće s korom, kravlje mlijeko i, naravno, orašasti plodovi. (Rancé i sur; 2003)

Simptomatska FA i senzitivizacija na alergene u hrani povezani su s razvojem astme i kod mlade i kod starije djece: zabilježeno je da je ta povezanost jača među djecom s višestrukim ili teškim FA. Štoviše, djeca s FA razvijaju astmu ranije i s većom prevalencijom od djece bez FA. Vrijedi i suprotno jer je astma faktor rizika za ustrajnost alergije na hranu. Alergija na hranu i senzitivizacija na hranu također se mogu smatrati važnim pokazateljima za predviđanje težine astme. Doista se izvještava da su djeca s FA i senzibilizacijom na barem jedan alergen

prehrambenog podrijetla (npr. jaje, mlijeko, soja, kikiriki, pšenica i riba) imala lošiju plućnu funkciju, veće stope hospitalizacije, posjeta hitnim službama, uporabe sistemskih glukokortikoida ili potrebe za mehaničkom ventilacijom kod ozbiljnog pogoršanja astme. (Arasi i sur; 2019)

Rancé F. i Dutau G. su 2002. proveli istraživanje čiji je cilj bio standardiziranim testovima definirati učestalost astme izazvane hranom te raspodjelu alergena iz hrane u djece koja imaju alergiju na hranu. Istraživanje je provedeno na 163 astmatične djece s alergijom na hranu praćenom u prosjeku 5,5 godina. Astma je identificirana testovima plućne funkcije (reverzibilnost FEV1 na bronhodilatatore), a alergija na hranu dokumentirana je „Double-blind placebo-controlled food challenge“ (DBPCFC), dvostruko slijepim placebo kontroliranim „izazovom“ hranom. Pozitivni DBPCFC uočeni su u 250 od 385 testova (65 %) kod navedene 163 djece. Hrana koja je najčešće izazivala reakcije bila je: kikiriki (30,6 %), jaje (23,1 %), kravlje mlijeko (9,3 %), senf (6,9 %), bakalar (6 %), škampi (4,5 %), kivi (3,6 %), lješnjak (2,7 %), indijski orah (2,1 %), badem (1,5 %), češnjak (1,2 %). Respiracijski simptomi bili su sindrom oralne alergije u 13 slučajeva (5,3 %), rinokonjunktivitis u 15 slučajeva (6,1 %), astma u 23 slučaja (9,5 %). Samo je sedmero ovih ispitanika imalo samo astmu kao dijagnozu (2,8 % slučajeva). Prevalencija je astme izazvane alergijom na hranu niska. U ovom istraživanju astma izazvana alergijom na hranu odnosila se na 9,5 % slučajeva, a samo astma utvrđena je u samo 2,8 % slučajeva. Astma koju prouzročuju alergeni u hrani potencijalno je ozbiljna. ( Rancé i Dutau, 2002)



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ovim radom želi se ispitati povezanost serumske razine antitijela ukupnoga i specifičnog IgE među pacijentima s dijagnozom atopijskog dermatitisa i astme te kontrolne skupine pacijenata. Temeljem dobivenih podataka pokušat će se potvrditi nulta hipoteza; imaju li pacijenti s atopijskim dermatitisom ili astmom više serumske koncentracije antitijela ukupnoga i specifičnog IgE nego kontrolna skupina ispitanika.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzorci i populacija

Analizom su obuhvaćeni uzorci pacijenata kojima je liječnik izdao uputnicu za određivanje serumske koncentracije antitijela ukupnoga i specifičnog IgE. Određivanje se radilo u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Referentni centar za kliničko-laboratorijsku imunodijagnostiku hematoloških i imunoloških bolesti Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske. U ispitivanje su uključeni prioritetno pacijenti s dijagnozom atopijskog dermatitisa (L20) te pacijenti s dijagnozom astme (J45). Kao kontrolna skupina uključeni su pacijenti koji približno odgovaraju po spolu i dobi, a koji se ne vode pod dijagnozom atopija ili respiracijskom dijagnozom.

Kao uzorak koristio se ljudski serum, odnosno krv izvađena u epruvetu bez antikoagulanta i/ili bez gela, s crvenim čepom. Za spomenutu vrstu uzorka nisu dokazane interferencije kod koncentracija: bilirubina < 200 mg/L, hemoglobina < 384 mg/dL i triglicerida < 5000 mg/dL. Dokazano je da biotin u uzorku > 1500 ng/mL može znatno utjecati na točnost rezultata.

U ovaj rad uključeno je 1077 pacijenata s dijagnozom AD-a ili astme, dok je za kontrolnu skupinu odabran isti broj pacijenata bez spomenutih dijagnoza. Od ukupnog broja pacijenata s dijagnozom AD-a ili astme 460 je muškog spola, a 617 ženskog spola. Prosječna dob pacijenata oba spola s dijagnozom AD-a iznosi devet godina (1 – 30), dok je prosječna dob za već spomenute pacijente, ali s dijagnozom astme 46 godina (8 – 77). Prosječna dob pacijenata u kontrolnoj skupini iznosi 36 godina (1 – 91).

Podaci o pacijentima uzimani su retrospektivno iz Laboratorijskoga informacijskog sustava Kliničkoga bolničkog centra Zagreb (Bionet LIS In2). Svi uzorci obrađeni su anonimnizirano, korišteni su samo nalaz, spol i dijagnoza bez mogućnosti identificiranja pacijenta.

Ispitivanje je provedeno u redovnom radu Odjela za laboratorijsku imunologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Referentni centar za kliničko-laboratorijsku imunodijagnostiku hematoloških i imunoloških bolesti Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske, u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, na analizatoru IMMULITE 2000 XPi tvrtke Siemens.

Ispravnost analizatora kontrolira se unutarnjom i vanjskom kontrolom kvalitete u sklopu akreditacije HR EN ISO 15189.

### 3.2 Unutarnja analitička kontrola

Za svaki parametar koriste se dva kontrolna uzorka različitih koncentracija. Neki su kontrolni uzorci spremni za upotrebu, dok su drugi liofilizati. Liofilizirani uzorci otapaju se prema uputama proizvođača DVI-170-6 *Immulite XPi, kontrolni materijal, original insert packages* (volumen, vrsta otapala i vrijeme stabilizacije). Jednom otvorene/otopljene kontrole razdjeljuju se na alikvote iz kojih je moguće jednokratno ponoviti određivanje(a). Takve se porcije označavaju i prema uputama proizvođača koje definiraju temperaturu i dužinu stabilnosti spremaju. Smrzavanje i odmrzavanje kontrolnih uzoraka dopušteno je samo jednom. Koriste se sljedeći kontrolni uzorci: za ukupni IgE: IECA 1 i IECA 2; za specifični IgE: L2UNC1 i L2UNC2. Kontrolni uzorci analiziraju se neposredno prije serije uzoraka. Usto, kontrolni uzorci obrađuju se i u sljedećim situacijama: nakon svake kalibracije, nakon preventivnog servisa na dijelovima važnim u samom određivanju koncentracije analita, kvara uređaja i kod pojave sumnje u pouzdanost rezultata analize iz bilo kojeg razloga. Rezultati analiziranih komercijalnih kontrolnih uzoraka smatraju se prihvatljivima kada su u rasponu koji je preporučio proizvođač (najčešće  $\pm 2SD$  od ciljne vrijednosti).

### 3.3 Načelo metode

Načelo određivanja imunoglobulina E na analizatoru Siemens Immulite 2000 XPi jest kemiluminiscencijska imunoanaliza. Anti IgE protutijela obilježena enzimom alkalnom fosfatazom (vezana na kuglice) reagiraju s ukupnim IgE protutijelom u uzorku seruma ispitanika. Tijekom početne imunosne reakcije između antitijela u reagensu i analita u uzorku, komponenta reagensa nazvana alkalna fosfataza (poznata kao konjugat) vezana je na kuglicu u reakcijskoj epruveti. Količina alkalne fosfataze koja se vezala izravno je proporcionalna (za sendvič-test) ili obrnuto proporcionalna (za kompetitivni test) koncentraciji analita u uzorku pacijenta. Nakon što je reakcijska epruveta isprana, luminogeni supstrat dodaje se u reakcijsku epruvetu. Pet minuta nakon dodavanja reakcijska epruveta dolazi ispred fotomultiplikacijske cijevi (PMT) gdje se mjeri svjetlo nastalo luminogenom reakcijom. Enzimski pojačana reakcija u sustavu proizvede produljenu izlaznu svjetlost koja prouzrokuje da cijev svijetli. U luminogenoj reakciji supstrat (adamantil-dioksetan-fosfat) je defosforiliran u nestabilni intermedijer s pomoću alkalne fosfataze vezane na kuglicu. Nestabilni intermedijer brzo se i spontano raspada na dioksetan, emitirajući foton svjetlosti. Količina svjetlosti koja se emitira izravno je proporcionalna količini alkalne fosfataze. Uređaj Immulite 2000 XPi prema

kalibracijskoj krivulji automatski izračunava vrijednosti koncentracije ukupnog IgE-a za svaki uzorak.

Donja granica detekcije ove metode za ukupni IgE je 1 kIU/mL, a gornja je 2000 kIU/mL.

Donja granica detekcije za određivanje specifičnog IgE je 0,1 kU/L, a gornja 1000 kU/L.

U usporedbi s drugim metodama detekcije, kemiluminiscencija ima najviši stupanj osjetljivosti, bolji čak i od dostupnih radioimunoanaliza. Ova metoda ima širok dinamički raspon, veći od imunoenzimskih metoda, visoku specifičnost rezultata izraženih u kvantitativnom obliku, visok stupanj automatizacije i kliničke implikacije povezane sa smanjenjem vremena obrade i sposobnost izvođenja velikog broja testova na antitijela (čak i različitih izotipova).

### 3.4 Analiti

Vrste analita koje su mjerene u ovom radu jesu: ukupni IgE i specifični IgE za alergene ekstrakte: *dermatophagoides pteronyssinus* (d1), *dermatophagoides farinae* (d2), dlaka mačke (e1), dlaka psa (e5), bjelanjak (f1), kikiriki (f13), soja (f14), kravlje mlijeko (f2), riba – bakalar (f3), pšenično brašno (f4), žutanjak (f75), gluten (f79), *dactylis glomerata* (g3), *phleum pratense* (g3), *poa pratensis* (g6), otrov pčele (i1), otrov ose (i3), *blatella germanica* (i6), *aspergillus fumigatus* (m3), *alternarira alternata* (m6), *betula verrucosa* (t3), *corylus avellana* (t4), *ambrosia elatior* (w1) i *artemisia vulgaris* (w6).

### 3.5. Statističke metode

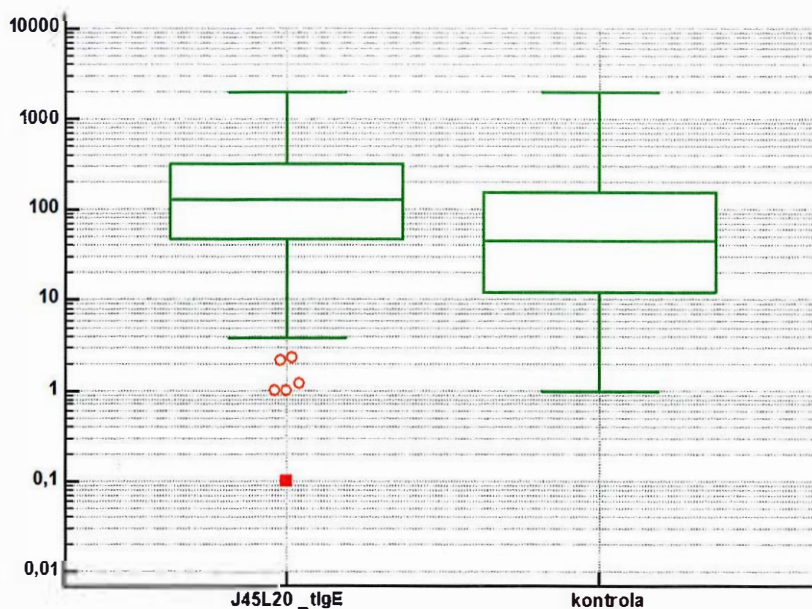
Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2019, Microsoft office i MedCalc v.17.8.6. Normalnost raspodjele podataka ispitana je nezavisnim nominalnim parnim Mann-Whitney testom. Wilcoxonov parni test primijenjen je za ispitivanje statistički bitne razlike u koncentracijama ukupnoga i specifičnog IgE u skupinama pacijenata s astmom i atopijskim dermatitisom u usporedbi s kontrolnom skupinom. Svi rezultati interpretirani su na razini statističke važnosti  $P < 0,05$ .

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Na temelju dobivenih rezultata za 234 pacijenta, koji su vidljivi u tablici 1., vidi se da postoji statistički bitna razlika između koncentracije ukupnog IgE-a kod pacijenata sa AD-om i astmom u odnosu na pacijente koji nemaju te dvije dijagnoze ( $P < 0,0001$ ). Medijan za koncentraciju ukupnog IgE-a za pacijente bez inhacijske i dermatološke dijagnoze upola je manji od medijana pacijenata s tim dijagnozama. U istraživanju koje je objavio Dai 2007. prikazuje se kako većina bolesnika s AD-om i astmom ima prisutna IgE antitijela u većim koncentracijama nego kod ostalih ljudi, što je također potvrđeno ovim rezultatima.

Tablica 1. Usporedba koncentracije ukupnog IgE kod osoba s AD-om i astmom i kontrolne skupine

Parametar	Astma i atopijski dermatitis; tIgE (N=234)	Kontrolna skupina; tIgE (N=234)	P vrijednost
	117,0 (87,2 – 153,9)	44,35 (12,4 – 133,0)	< 0,0001

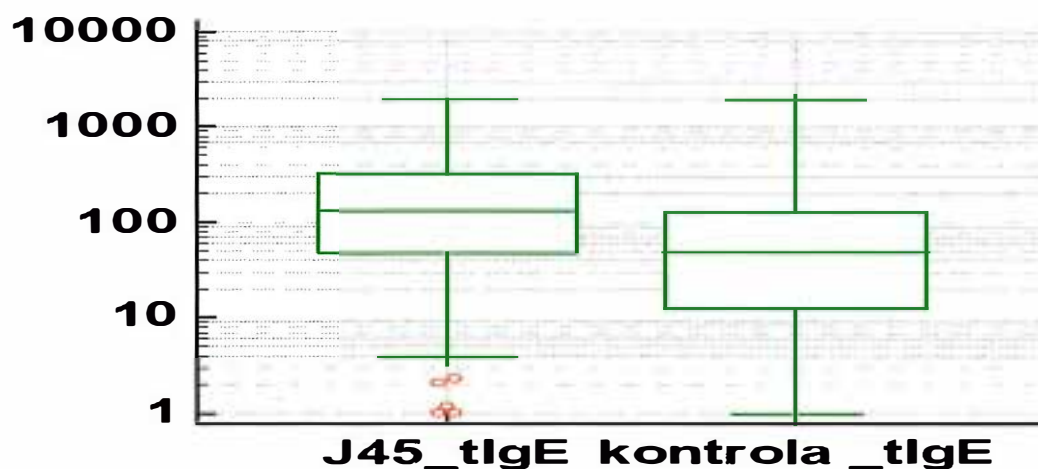


Slika 5. Prikaz raspona koncentracija ukupnog IgE kod astmatičara i osoba s AD-om i kontrolne skupine

Rezultati dobiveni za 152 pacijenta s astmom (tablica 2.) u usporedbi s pacijentima bez inhalacijske dijagnoze također pokazuju postojanje statistički bitne razlike u koncentracijama ukupnog IgE-a ( $P < 0,0001$ ). U ovoj usporedbi medijan je za koncentracije IgE kod astmatičara čak i 2,5 puta veći od medijana za koncentracije ukupnog IgE kod osoba bez dijagnoze astme. Ovi rezultati usporedivi su s istraživanjem koje su napravili Rance i Dutau 2002. u kojem je objašnjeno kako je kod djece s astmom čak 14 puta veća mogućnost za očitovanje alergije te kako je više od polovine djece s astmom imalo alergijske reakcije, odnosno povećanu koncentraciju ukupnog IgE.

Tablica 2. Usporedba koncentracija ukupnog IgE kod pacijenata s astmom i kontrolne skupine

Parametar	Astma; tIgE (N=152)	Kontrolna skupina; tIgE (N=152)	P vrijednost
	130,5 (97,4 – 177,3)	49,4 (31,6– 68,4)	< 0, 0001



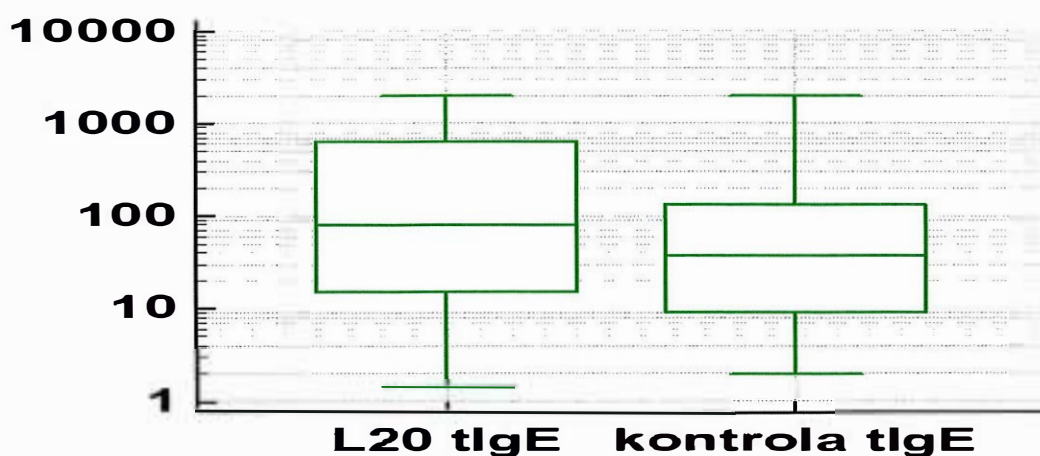
Slika 6. Prikaz raspona koncentracija ukupnog IgE kod astmatičara i kontrolne skupine



Kod skupine od 82 pacijenata s atopijskim dermatitisom i kontrolne skupine s istim brojem pacijenata, ali bez dijagnoze AD-a (tablica 3.), vidljiva je statistički važna razlika ( $P = 0,0229$ ). Iako se zbog vrijednosti  $P$  čini kako su koncentracije ukupnog IgE-a malo sličnije, na temelju medijana jasno je da je medijan za kontrolnu skupinu dvostruko manje vrijednosti od skupine pacijenata s AD-om. Dobivene vrijednosti upozoravaju na veću učestalost alergija u osoba s dijagnozom AD-a, kao što su i u svom istraživanju objavili Cartledge i Chan (2018) da je AD izraziti okidač za IgE-om potpomognutu alergiju.

Tablica 3. Usporedba koncentracija IgE kod pacijenata s AD-om i kontrolne skupine

Parametar	Atopijski dermatitis; <i>tIgE</i> ( $N=82$ )	Kontrolna skupina; <i>tIgE</i> ( $N=82$ )	$P$ vrijednost
	80,5 (15,1 – 649,0)	38,35 (9,0 – 134,0)	0,0229

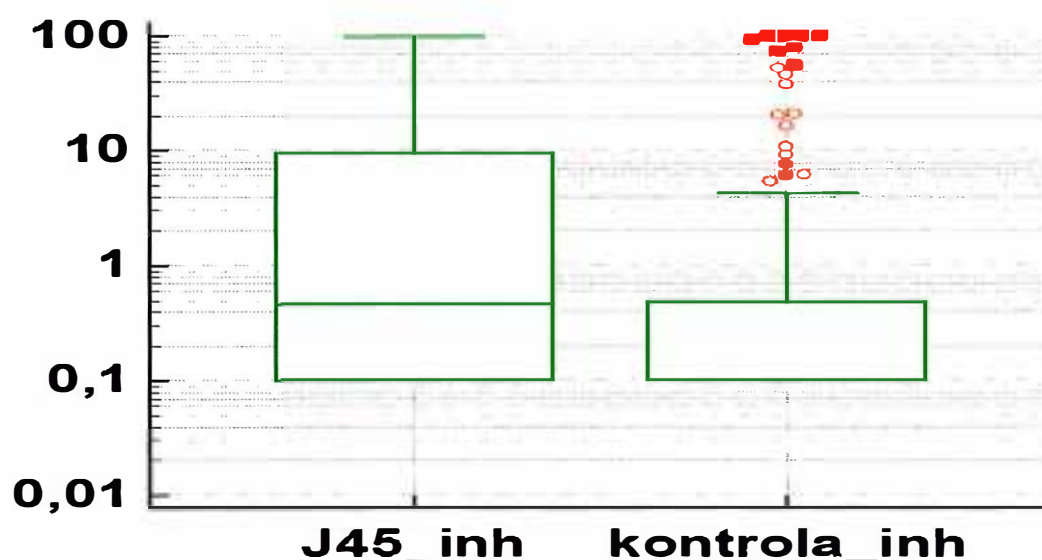


Slika 7. Prikaz raspona koncentracija ukupnog IgE kod pacijenata s AD-om i kontrolne skupine

Kod usporedbe dobivenih koncentracija sIgE na inhalacijske alergene u 209 astmatičara i jednakog broja osoba bez spomenute dijagnoze (tablica 4.) dobivena je statistički bitna razlika ( $P < 0,0001$ ). Vidi se i znatna razlika u medijanima gdje je medijan u skupini astmatičara nekoliko puta veći od medijana kontrolne skupine. Mims (2015) je naveo kako je izrazita senzibilizacija na inhalacijske alergene također povezana s razvojem astme kao i to da su oni među jačim okidačima astmatičnih napadaja, što se može povezati s ovdje dobivenim rezultatima.

Tablica 4. Usporedba koncentracija sIgE na inhalacijske alergene kod astmatičara i kontrolne skupine

Parametar	Astma; sIgE, inhalacijski alergeni (N=209)	Kontrolna skupina; sIgE, inhalacijski alergeni (N=209)	P vrijednost
	0,46 (0,1 – 9,7)	0,1 (0,1 – 0,5)	< 0,0001

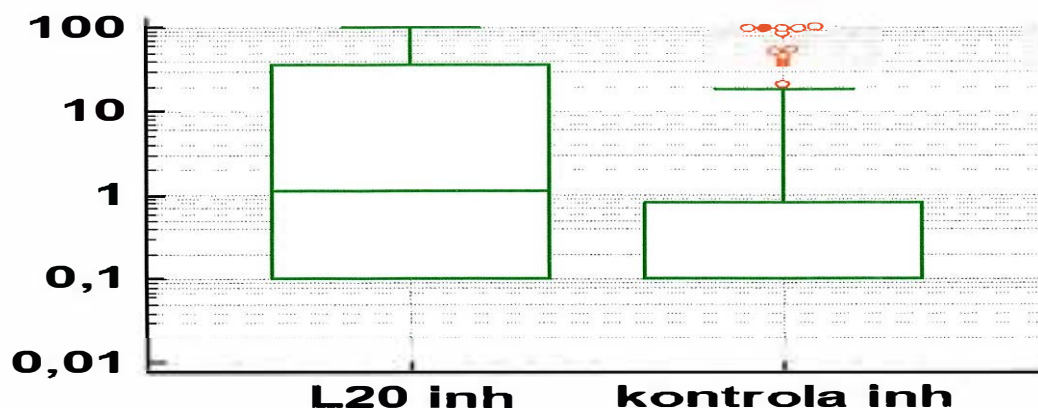


Slika 8. Prikaz raspona koncentracije sIgE na inhalacijske alergene kod astmatičara i kontrolne skupine.

Rezultati dobiveni za 145 pacijenata s dijagnozom AD-a u usporedbi s istim brojem pacijenata kontrolne skupine (tablica 5.) daju statistički važnu razliku između ove dvije skupine ( $P < 0,0001$ ) za koncentracije sIgE na inhalacijske alergene. Razlika se također primjećuje i u medijanu koji je za skupinu pacijenata s AD-om čak 10 puta veći nego medijan pridružen kontrolnoj skupini. Ovi rezultati upozoravaju na veću senzibilizaciju na inhalacijske alergene kod osoba s dermatitisom, o čemu je izvijestio i Dai (2007). Također je objavio da većina pacijenata s AD-om imaju IgE antitijela na specifični antigen tijekom više godina, što se isto povezuje s ovdje prikazanim rezultatima.

Tablica 5. Usporedba koncentracija sIgE na inhalacijske alergene kod osoba s AD-om i kontrolne skupine

Parametar	Dermatitis; sIgE, inhalacijski alergeni (N=145)	Kontrolna skupina; sIgE, inhalacijske alergeni (N=145)	P vrijednost
	1,13 (0,1 – 37,4)	0,1 (0,1 – 0,8)	< 0,0001

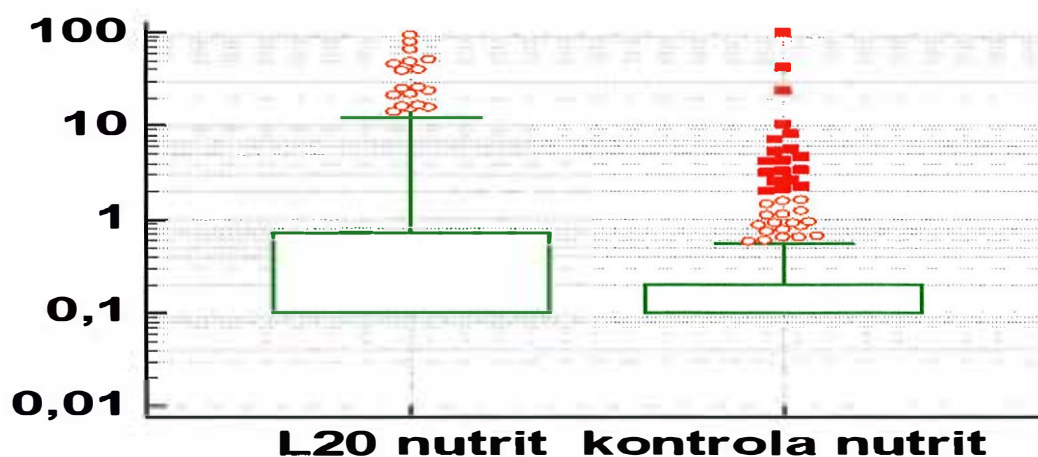


Slika 9. Prikaz raspona koncentracija sIgE na inhalacijske alergene kod pacijenata s AD-om i kontrolne skupine.

U usporedbi skupine 255 osoba s AD-om i kontrolne skupine osoba istog broja, u kojoj je uspoređivana koncentracija sIgE na nutritivne alergene (tablica 6.), dobivena je statistički bitna razlika ( $P = 0,0021$ ). Iako su medijani obiju skupina jednaki, interkvartilni raspon za kontrolnu skupinu ipak je dosta manji od onog za skupinu osoba s AD-om. Bez obzira na jednakost medijana, vrijednost  $P$  i dalje govori o bitnoj razlici. To znači da osobe s AD-om imaju veće koncentracije sIgE na nutritivne alergene nego osobe bez te dijagnoze. Takav zaključak imali su i Mavroudi i sur. (2016) koji su u svom radu objavili da je jedno u četvero djece s AD-om imalo alergiju na hranu kao i visoke koncentracije sIgE te da je skoro polovina djece s AD-om bila senzibilizirana na nutritivne alergene.

Tablica 6. Usporedba koncentracija sIgE na nutritivne alergene kod osoba s AD-om i kontrolne skupine

Parametar	Dermatitis; sIgE, nutritivni alergeni ( $N=255$ )	Kontrolna skupina; nutritivni alergeni ( $N=255$ )	$P$ vrijednost
	0,1 (0,1 – 0,72)	0,1 (0,1 – 0,20)	0,0021



Slika 10. Prikaz raspona koncentracija sIgE na nutritivne alergene kod osoba s AD-om i kontrolne skupine.

Razlog zbog kojeg osobe s astmom ili atopijskim dermatitisom imaju češće alergijske bolesti dosta je dugo bio predmetom brojnih studija. Danas se smatra kako je kod AD-a primarni uzrok nedostatna funkcionalnost epitelne barijere povezana s disfunkcijom urođenoga i prilagodljivog imunskog sustava kože te disbiozom, kao i smanjen izražaj gena za filagrin koji je povezan s funkcijom kožne barijere. Ozljede izazvane ogrebotinama ili iritirajućim agensima mogu povećati apsorpciju alergena kroz kožu olakšavajući tako senzibilizaciju i potičući upalu kože. AD je često povezan s IgE potpomognutom nutritivnom alergijom: smatra se da je prepoznavanje alergena iz hrane kroz stanice koje očituju antigen u ekcematoznoj koži važan posrednik senzibilizacije na hranu. Rizik od senzibilizacije kroz kožu veći je kad filagrina nema ili ga nedostaje, kao što je utvrđeno na mišjim modelima. Pojačana reaktivnost na pokretače iz okoline, prisutna i kod AD-a i kod astme, upućuje na zajedničke patofiziološke putove. (Amat i sur; 2018) Kod astme se najvećim problemom smatraju inhalacijski alergeni jer su donji dišni putovi stalno u upalnom stanju i dolazi do opstrukcije protoka zraka. Zbog toga se u tih bolesnika velikom prijetnjom smatra alergijski rinitis gdje su pod upalom gornji dišni putovi. Postoje snažni epidemiološki dokazi koji pokazuju usku vezu između alergijskog rinitisa i astme i upućuju na zajedničku genetičku pozadinu obje bolesti. Neki geni mogu biti ograničeni na nazalne simptome. U općoj populaciji alergija na grinje kućne prašine ili životinjsku perut faktor je rizika za astmu i rinitis, dok je alergija na pelud čimbenik rizika za rinitis. Predloženo je nekoliko mehanizama za povezivanje nekontroliranoga alergijskog rinitisa i pojave ili pogoršanja astme: nazalna iritacija potiče oslobađanje medijatora, što zauzvrat može izazvati bronhokonstrikciju, a lučenje sluzi iz nosa može izazvati kontrakciju bronhnih glatkih mišića ili upalu donjih dišnih putova, dok disanje na usta zbog začepljenog nosa može imati ulogu u težini astme. (Bousquet i sur; 2001) Preosjetljivost kože slijedi preosjetljivost dišnih putova na isti alergen i jedan je od najsnažnijih predviđatelja razvoja dječje astme. Tipično je fenotip alergijske astme povezan s eozinofilijom, povišenim serumskim IgE i Th2 citokinima. Utvrđeno je da je alergija na pelud povezana s različitim alergijama na hranu, Th2-upalom probavnog sustava i astmom. (Del Giacco i sur; 2017)



## 5. ZAKLJUČAK

Atopijski dermatitis i astma jesu bolesti s izrazito rastućom prevalencijom u modernom društvu čija očitovanja znatno utječu na kvalitetu života. Alergije su također u porastu u cijelom svijetu i nerijetko se pojavljuju u osoba s mnogim drugim dijagnozama. Budući da alergije pogoršavaju simptome i očitovanja astme i AD-a, veoma je bitno bilo utvrditi imaju li osobe s astmom i AD-om veću učestalost alergijskih bolesti, odnosno imaju li veće koncentracije ukupnoga i specifičnog IgE u odnosu na osobe bez tih dijagnoza jer koncentracije ukupnoga i specifičnog IgE koreliraju s alergijskim bolestima. Potvrđena je nulta hipoteza: utvrđeno je kako pacijenti s atopijskim dermatitisom ili astmom imaju više serumske koncentracije antitijela ukupnoga i specifičnog IgE u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Analizirajući rezultate u osobe s astmom i AD-om zajedno, kao i odvojeno, vidljivo je da imaju veće koncentracije ukupnoga i specifičnog IgE u odnosu na osobe bez navedenih dijagnoza. Značenje ovih rezultata u neposrednoj je vezi s činjenicom da su alergijske bolesti češće u osoba s AD-om i astmom nego u ostatku populacije. To se osobito odnosi na astmatičare i njihovu senzibilizaciju na inhalacijske alergene, kao što se veća senzibilizacija na nutritivne alergene pripisuje osobama s AD-om.

## 6. LITERATURA

1. Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. Stanična i molekularna imunologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 417-434
2. Amat F, Soria A, Tallon P, Bourgoïn-Heck M, Lambert N, Deschildre A, Just J. New insights into the phenotypes of atopic dermatitis linked with allergies and asthma in children: An overview. *Clin Exp Allergy*, 2018, 48, 919-934.
3. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjić D. Imunologija, Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 308-321
4. Arasi S, Porcaro F, Cutrera R, Fiocchi AG. Severe Asthma and Allergy: A Pediatric Perspective. *Front Pediatr*, 2019, 11, 7-28.
5. Asthma classification, <http://asthma99.com/asthma.html>, pristupljeno 24.04. 2021.
6. Atopic dermatitis linked high disease burden, <https://www.thedermatologist.com/news/atopic-dermatitis-linked-high-disease-burden>, pristupljeno 24.4.2021.
7. Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2001, 108, 147–334.
8. Cartledge N, Chan S. Atopic Dermatitis and Food Allergy: A Paediatric Approach. *Curr Pediatr Rev*, 2018, 14, 171-179.
9. Dai YS. Allergens in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2007, 33, 66-157.
10. Del Giacco SR, Bakirtas A, Bel E, Custovic A, Diamant Z, Hamelmann E, Heffler E, Kalayci Ö, Saglani S, Sergejeva S, Seys S, Simpson A, Bjermer L. Allergy in severe asthma. *Allergy*, 2017, 72, 207-220.
11. Dhami S, Sheikh A. Estimating the prevalence of aero-allergy and/or food allergy in infants, children and young people with moderate-to-severe atopic eczema/dermatitis in primary care: multi-centre, cross-sectional study. *J R Soc Med*, 2015, 108, 36-229.
12. Dodig S, Čepelak I. The potential of component-resolved diagnosis in laboratory diagnostics of allergy. *Biochem Med*, 2018, 2, 15-28.
13. Dodig S. Primjena rekombinantih alergena u dijagnostici alergija. STRATEGIJA ZBRINJAVANJA ALERGIJSKIH BOLESTI U RH. Zagreb, 2017, 21-22
14. Faber MA, Pascal M, El Kharbouchi O, Sabato V, Hagendorens MM, Decuyper II, Bridts CH, Ebo DG. Shellfish allergens: tropomyosin and beyond. *Allergy*, 2017, 72, 842-848.

15. Finkina EI, Melnikova DN, Bogdanov IV, Ovchinnikova TV. Plant Pathogenesis-Related Proteins PR-10 and PR-14 as Components of Innate Immunity System and Ubiquitous Allergens. *Curr Med Chem*, 2017, 24, 1772-1787.
16. García BE, Lizaso MT. Cross-reactivity syndromes in food allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2011, 21, 70-162.
17. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8, 205-222.
18. Katzung GB, Masters BS, Trevor JA. Temeljna i klinička Farmakologija, Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 509-529.
19. LaHood NA, Patil SU. Food Allergy Testing. *Clin Lab Med*, 2019, 39, 625-642.
20. Lumen, Microbiology, Diseases of the immune system, Hypersensitivities <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/hypersensitivities/>, pristupljeno 24.04.2021.
21. Mavroudi A, Karagiannidou A, Xinias I, Cassimos D, Karantaglis N, Farmaki E, Imvrios G, Fotoulaki M, Eboriadou M, Tsanakas J. Assessment of IgE-mediated food allergies in children with atopic dermatitis. *Allergol Immunopathol*, 2017, 45, 77-81.
22. Mims, J. W. Asthma: definitions and pathophysiology. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 2015, 5, 2-6.
23. Rancé F, Dutau G. Asthma and food allergy: report of 163 pediatric cases. *Arch Pediatr*, 2002, 9, 402-407.
24. Rancé F, Micheau P, Marchac V, Scheinmann P. Food allergy and asthma in children. *Rev Pneumol Clin*, 2003, 59, 109-122.
25. Rodríguez Del Río P, Díaz-Perales A, Sánchez-García S, Escudero C, Ibáñez MD, Méndez-Brea P, Barber D. Profilin, a Change in the Paradigm. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2018, 28, 1-12.
26. Thyssen JP, Kezic S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014, 134, 792-801.
27. Topić E, Janković S, Primorac D, Štefanović M. Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 2017, 503-512.
28. Virtanen T, Kinnunen T, Rytönen-Nissinen M. Mammalian lipocalin allergens-insights into their enigmatic allergenicity. *Clin Exp Allergy*. 2012, 42, 494-504.

## 7. SAŽETAK

Alergije ili atopijske bolesti spadaju u tip I preosjetljivosti koja se naziva neposredna (ili anafilaktička), a prouzročena je IgE protutijelima koja su specifična za antigene iz okoliša.

Atopijski dermatitis, ekcem, (AD) dio je atopijske trijade (atopijski dermatitis, alergijski rinitis i astma), ali se može pojaviti i samostalno. To je čest kožni poremećaj koji može biti prouzročen reakcijom kasne faze na alergen u koži.

Astma je upalna bolest prouzročena ponavljajućom reakcijom neposredne preosjetljivosti i alergijskom reakcijom kasne faze u plućima koja prouzročuju razvoj kliničko patološke trijade koju čine povremena i reverzibilna opstrukcija dišnih putova, kronična upala bronha s infiltracijom eozinofilima te hipertrofija glatkih mišićnih stanica bronha s pojačanom reakcijom na bronhokonstriktore.

Danas je određivanje koncentracije ukupnog IgE (tIgE), kao jednostavna i automatizirana metoda, sastavni dio postupka probira za osobe s atopijom. Nakon toga slijedi postupak identifikacije alergena koji su pokrenuli alergijsku reakciju određivanjem specifičnog IgE u odnosu na moguće uzročne alergene na što su uputili SPT, anamneza i klinička slika pacijenta.

Budući da alergije pogoršavaju simptome i očitovanja astme i AD, veoma je bitno bilo utvrditi imaju li osobe s astmom i AD veću učestalost alergijskih bolesti, odnosno imaju li veće koncentracije ukupnoga i specifičnog IgE u odnosu na osobe bez tih dijagnoza, a koncentracije ukupnoga i specifičnog IgE koreliraju s alergijskim bolestima. Potvrđena je nulta hipoteza: utvrđeno je kako pacijenti s atopijskim dermatitisom ili astmom imaju više serumske koncentracije antitijela ukupnoga i specifičnog IgE u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Analizirajući rezultate u osobe s astmom i AD zajedno, kao i odvojeno, vidljivo je da imaju veće koncentracije ukupnoga i specifičnog IgE u odnosu na osobe bez navedenih dijagnoza. Značenje ovih rezultata u neposrednoj je vezi s činjenicom da su alergijske bolesti češće u osoba s AD-om i astmom nego u ostatku populacije.

U usporedbi 234 pacijenta sa astmom ili AD-om s istim brojem kontrolnih pacijenata, medijan za koncentraciju tIgE bio je 117 (87,2 – 153,9), a za kontrolnu skupinu 44,35 (12,4 – 133,0), dok je  $P < 0,0001$ . Kod 152 pacijenta s astmom medijan za koncentraciju tIgE bio je 130,5 (97,4 – 177,3), a za kontrolnu skupinu istog broja pacijenata 49,4 (31,6– 68,4) dok je u usporedbi  $P < 0,0001$ . U skupini od 82 pacijenta s AD-om medijan za koncentraciju tIgE bio je 80,5 (15,1 – 649,0), a za isti broj kontrolnih pacijenata 38,35 (9,0 – 134,0), dok je  $P = 0,0229$ .

## 7. SUMMARY

Allergies or atopic diseases belong to type I hypersensitivity which is called immediate (or anaphylactic) and is caused by IgE antibodies that are specific for antigens from the environment.

Atopic dermatitis, eczema, (AD) is a member of the atopic triad (atopic dermatitis, allergic rhinitis and asthma), but it can also occur alone. It is a frequent skin disorder that may be due to the late phase reaction to an allergen in the skin.

Asthma is an inflammatory disease caused by repeated immediate hypersensitivity reaction and late-phase allergic reaction in the lungs that give rise to the development of clinico-pathological triad consisting of occasional and reversible airway obstruction, chronic inflammation of the bronchial tubes with eosinophil infiltration and hypertrophy of the bronchial smooth muscle cells with enhanced reaction to bronchoconstrictor agents.

As a simple and automated method, determination of total IgE (tIgE) concentration is currently a component of screening in individuals with atopia. It is followed by identifying allergens that have initiated allergic reaction, which is done by determining a specific IgE in relation to potential causative allergens indicated by SPT, medical history and patient's clinical data.

As allergies aggravate the symptoms and manifestations of asthma and AD, it has been highly important to ascertain if individuals with asthma and AD have an increased frequency of allergic reactions, i.e. whether they have higher total- and specific IgE levels when compared to individuals without such diagnoses since total and specific IgE concentrations are correlated with allergic diseases. Zero hypothesis has been confirmed: it has been established that patients with atopic dermatitis or asthma have higher serum total- and specific IgE antibody concentrations as compared to the control group. On analyzing results in individuals with asthma and AD or one of these diseases, it was evident that they have higher total- and specific IgE levels in relation to individuals without those diagnoses. The importance of these results is directly associated with the fact that allergic diseases are more frequent in individuals with AD and asthma than in the rest of population.

On comparison of 234 asthma or AD patients with the same number of control subjects, the median obtained for tIgE concentration was 117 (87.2–153.9) in the patient group and 44.35 (12.4–133.0) for the control group, while  $P < 0.0001$ . In 152 asthma patients, the tIgE concentration median was 130.5 (97.4–177.3), and in the same number of control subjects it was 49.4 (31.6–68.4),  $P < 0.0001$ . In the group of 82 AD patients, the tIgE concentration median was 80.5 (15.1–649.0), and it was 38.35 (9.0–134.0) for the same number of control subjects, with  $P = 0.0229$ .



## 8. PRILOZI

### 8.1. Popis skraćenica

AD – atopijski dermatitis

BD – bronhodilatatori

cAMP – ciklički adenzin-monofosfat

CR - križna reaktivnost (engl. *cross reactivity*)

DBPCFC – engl. *Double-blind placebo-controlled food challenge*

ECP – eozinofilni kationski protein (engl. *eosinophil cationic protein*)

FA – alergija na hranu (engl. *food allergy*)

FLG – filagrin

IgE – imunoglobulin E

ICS - inhalacijski kortikosteroidi (engl. *inhaled corticosteroids*)

IL-4 – interleukin 4

IL-5 – interleukin 5

IL-13 – interleukin 13

LTC4 – leukotrien C4

LTD4 – leukotrien D4

LTD5 – leukotrien E4

LTP – nespecifični protein za prijenos lipida (engl. *lipid transfer protein*)

OFC – „oralni test na hranu“ (engl. *oral food challenge*)

PMT – fotomultiplikacijska cijev

PR – proteini povezani s patogenezom (engl. *pathogenesis related proteins*)

SABA – kratkotrajni beta-2 agonisti (engl. *short acting beta agonists*)

SC – *stratum corneum*

sIgE – specifični imunoglobulin E

SPT – kožni ubodni test (engl. *skin prick test*)

tIgE – ukupni imunoglobulin E (engl. *total immunoglobuline E*)

TNF – faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)

## UČESTALOST POZITIVNIH NALAZA UKUPNOG I SPECIFIČNIH IgE KOD PACIJENATA S ATOPIJSKIM DERMATITISOM I ASTMOM

Paula Cerovac

### SAŽETAK

Alergije ili atopijske bolesti spadaju u tip I preosjetljivosti koja se naziva neposredna (ili anafilaktička), a prouzročena je specifičnim IgE protutijelima koja su specifična za antigene iz okoliša. Atopijski dermatitis dio je atopijske trijade (atopijski dermatitis, alergijski rinitis i astma), ali može se pojaviti i samostalno. To je čest kožni poremećaj koji može biti prouzročen reakcijom kasne faze na alergen u koži. Astma je upalna bolest prouzročena ponavljajućom reakcijom neposredne preosjetljivosti i alergijskom reakcijom kasne faze u plućima koja prouzročuju razvoj kliničko patološke trijade koju čine povremena i reverzibilna opstrukcija dišnih putova, kronična upala bronha s infiltracijom eozinofilima te hipertrofija glatkih mišićnih stanica bronha s pojačanom reakcijom na bronhokonstriktore. Danas je određivanje koncentracije ukupnog IgE, kao jednostavna i automatizirana metoda, sastavni dio postupka probira za osobe s atopijom. Nakon toga slijedi postupak identifikacije alergena koji su pokrenuli alergijsku reakciju određivanjem specifičnog IgE u odnosu na moguće uzročne alergene na što su uputili SPT, anamneza i klinička slika pacijenta. Veoma je bitno bilo utvrditi imaju li osobe s astmom i AD-om veću učestalost alergijskih bolesti, odnosno imaju li veće koncentracije ukupnoga i specifičnog IgE u odnosu na osobe bez tih dijagnoza, a koncentracije ukupnoga i specifičnog IgE koreliraju s alergijskim bolestima. Potvrđena je nulta hipoteza – utvrđeno je kako pacijenti s atopijskim dermatitisom ili astmom imaju više serumske koncentracije anti-tijela ukupnoga i specifičnog IgE u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Analizirajući rezultate u osobe s astmom i AD-om zajedno, kao i odvojeno, vidljivo je da imaju veće koncentracije ukupnoga i specifičnog IgE u odnosu na osobe bez navedenih dijagnoza. Značenje ovih rezultata u neposrednoj je vezi s činjenicom da su alergijske bolesti češće u osoba s AD-om i astmom nego u ostatku populacije. U usporedbi 234 pacijenta s astmom ili AD-om s istim brojem kontrolnih pacijenata, medijan za koncentraciju tIgE bio je 117 (87,2 – 153,9), a za kontrolnu skupinu 44,35 (12,4 – 133,0), dok je  $P < 0,0001$ . Kod 152 pacijenta s astmom medijan za koncentraciju tIgE bio je 130,5 (97,4 – 177,3), a za kontrolnu skupinu istog broja pacijenata 49,4 (31,6 – 68,4), dok je u usporedbi  $P < 0,0001$ . U skupini od 82 pacijenta s AD-om medijan za koncentraciju tIgE bio je 80,5 (15,1 – 649,0), a za isti broj kontrolnih pacijenata 38,35 (9,0 – 134,0), dok je  $P = 0,0229$ .

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 33 stranice, 10 grafičkih prikaza, 6 tablica i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Ukupni IgE, specifični IgE, astma, atopijski dermatitis

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redoviti profesor Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redoviti profesor Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

**Dr. sc. Donatella Verbanac**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Roberta Petlevski**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2021.

## FREQUENCY OF POSITIVE RESULTS FOR TOTAL AND SPECIFIC IgE IN PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS AND ASTHMA

Paula Cerovac

### SUMMARY

Allergies or atopic diseases belong to type I hypersensitivity which is called immediate (or anaphylactic) and is caused by IgE antibodies that are specific for antigens from the environment. Atopic dermatitis, eczema, (AD) is a member of the atopic triad (atopic dermatitis, allergic rhinitis and asthma), but it can also occur alone. It is a frequent skin disorder that may be due to the late phase reaction to an allergen in the skin. Asthma is an inflammatory disease caused by repeated immediate hypersensitivity reaction and late phase allergic reaction in the lungs that give rise to the development of clinico-pathological triad consisting of occasional and reversible airway obstruction, chronic inflammation of the bronchial tubes with eosinophil infiltration and hypertrophy of the bronchial smooth muscle cells with enhanced reaction to bronchoconstrictor agents. As a simple and automated method, determination of total IgE (tIgE) concentration is currently a component of screening in individuals with atopia. It is followed by identifying allergens that have initiated allergic reaction, which is done by determining a specific IgE in relation to potential causative allergens indicated by SPT, medical history and patient's clinical data. It has been highly important to ascertain if individuals with asthma and AD have an increased frequency of allergic reactions, i.e. whether they have higher total- and specific IgE levels when compared to individuals without such diagnoses since total and specific IgE concentrations are correlated with allergic diseases. Zero hypothesis has been confirmed: it has been established that patients with atopic dermatitis or asthma have higher serum total- and specific IgE antibody concentrations as compared to the control group. On analyzing results in individuals with asthma and AD or one of these diseases, it was evident that they have higher total- and specific IgE levels in relation to individuals without those diagnoses. The importance of these results is directly associated with the fact that allergic diseases are more frequent in individuals with AD and asthma than in the rest of population. On comparison of 234 asthma or AD patients with the same number of control subjects, the median obtained for tIgE concentration was 117 (87.2–153.9) in the patient group and 44.35 (12.4–133.0) for the control group, while  $P < 0.0001$ . In 152 asthma patients, the tIgE concentration median was 130.5 (97.4–177.3), and in the same number of control subjects it was 49.4 (31.6–68.4),  $P < 0.0001$ . In the group of 82 AD patients, the tIgE concentration median was 80.5 (15.1–649.0), and it was 38.35 (9.0–134.0) for the same number of control subjects, with  $P = 0.0229$ .

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 33 pages, 10 figures, 6 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Total IgE, specific IgE, asthma, atopic dermatitis

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Donatella Verabanac, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Robert Petlevski, Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2021.