

# Značenje Dermatophagoides pteronyssinus-a u nastanku i pogoršanju atopijskog dermatitisa

---

Kuljanac, Ilko

Doctoral thesis / Disertacija

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:563599>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-18**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Ilko Kuljanac**

**Značenje *Dermatophagoides  
pteronyssinus*-a u nastanku i  
pogoršanju atopijskog dermatitisa**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2010.**

Rad je izrađen u Službi za kožne i spolne bolesti i u Imunološkom laboratoriju OB Karlovac

Voditelj rada: Prof. Dr. Sc. Višnja Milavec-Puretić

**ZAHVALNOST DUGUJEM:**

- Prof. dr. sc. Višnji Milavec-Puretić, mojoj mentorici, na pomoći, sugestijama i podršci tijekom izrade ovoga rada
  
- Prof. dr. sc. Mirni Šitum, na stručnoj i kolegijalnoj pomoći pri izradi rada.
  
- Akademiku Prof. dr. sc. Vladku Silobrčiću, na temeljima stručnog i znanstvenog rada.

# SADRŽAJ

<b>1.0. Uvod</b> .....	1
<b>1.1 LIMFNI SUSTAV</b> .....	1
1.1.1. Timus.....	1
1.1.2. Fabricijeva burza .....	2
1.1.3. Limfni čvor.....	3
1.1.4. Slezena i drugi limfni organi .....	3
<b>1.2. IMUNOKOMPETENTNE STANICE</b> .....	4
1.2.1. T limfociti.....	5
1.2.2. B limfociti .....	8
1.2.3. 0 limfociti .....	9
1.2.4. Stanice s pamćenjem .....	10
<b>1.3. FAGOCITNE I ANTIGEN PREZENTIRAJUĆE STANICE</b> .....	10
1.3.1. Antigen prezentirajuće stanice .....	11
1.3.2. Dendritične stanice .....	12
1.3.3. Makrofazi/Monociti .....	12
1.3.4. Neutrofilni leukociti .....	13
1.3.5. Eozinofilni leukociti .....	14
<b>1.4. MEDIJATORSKE STANICE</b> .....	15
1.4.1. Mastociti .....	15
1.4.2. Bazofilni leukociti .....	16
1.4.3. Trombociti .....	16
<b>1.5. MEDIJATORI ALERGIJSKIH REAKCIJA</b> .....	17
<b>1.6. GLAVNI KOMPLEKS TKIVNE PODUDARNOSTI</b> .....	22

<b>1.7. SURADNJA STANICA PRI IMUNOLOŠKOJ REAKCIJI</b> .....	23
<b>1.8. IMUNOGLOBULINI</b> .....	24
1.8.1. Imunoglobulin G .....	28
1.8.2. Imunoglobulin A .....	29
1.8.3. Imunoglobulin M .....	29
1.8.4. Imunoglobulin D .....	30
1.8.5. Imunoglobulin E .....	30
<b>1.9. KOMPLEMENT</b> .....	31
<b>1.10. TIPOVI ALERGIJSKIH REAKCIJA</b> .....	33
1.10.1. Rane reakcije preosjetljivosti (Tip I) .....	33
1.10.2. Citotoksične reakcije preosjetljivosti (Tip II): .....	34
1.10.3. Reakcije preosjetljivosti uzrokovane imunokompleksima (Tip III): .....	35
1.10.4. Kasna (stanična) preosjetljivost (Tip IV): .....	36
<b>1.11. ATOPIJA I ATOPIJSKE BOLESTI</b> .....	37
1.11.1. Atopijski dermatitis .....	38
1.11.2. Alergijski rinitis i astma .....	41
1.11.3. <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> .....	41
1.11.4. Dijagnostika alergijskih bolesti .....	42
1.11.5. Liječenje atopijskog dermatitisa .....	46
<b>2.0 HIPOTEZA I CILJEVI RADA</b> .....	49
<b>3.0. ISPITANICI I METODE RADA</b> .....	51
<b>3.1. ISPITANICI</b> .....	51
<b>3.2. METODE RADA</b> .....	51
3.2.1. Atopijski „patch“ test .....	51
3.2.2. Test ubodom .....	52

<b>3.3. STATISTIČKA OBRADA</b> .....	55
<b>4.0. REZULTATI</b> .....	56
<b>5.0. RASPRAVA</b> .....	68
<b>6.0. ZAKLJUČCI</b> .....	79
<b>7.0. SAŽETAK</b> .....	80
<b>8.0. SUMMARY</b> .....	82
<b>9.0. LITERATURA</b> .....	83
<b>10.0 ŽIVOTOPIS</b> .....	106

## POPIS SLIKA

**Slika 1.** Shematski prikaz građe imunoglobulina (str. 27)

**Slika 2.** Pozitivan atopijski „patch“ test na koncentracije *Dp 1* od 20.000 BJ/ml i 30.000 BJ/ml  
(str. 45)

## POPIS TABLICA:

**Tablica 1.** Ispitanici s atopijskim dermatitisom i članovi kontrolne skupine prema dobi i spolu (str. 56)

**Tablica 2.** Testiranje razlika u ukupnoj serumskoj koncentraciji IgE u ispitanika s atopijskim dermatitisom i članova kontrolne skupine (str. 57)

**Tablica 3.** Distribucija ukupne serumске koncentracije IgE u ispitanika s atopijskim dermatitisom i članova kontrolne skupine (str. 58)

**Tablica 4.** Ukupne serumске koncentracije IgE u ispitanika s atopijskim dermatitisom i ispitanika s atopijskim dermatitisom i respiratornim simptomima (str. 59)

**Tablica 5.** Specifični IgE prema *Dp1* u fazi remisije atopijskog dermatitisa u odnosu na članove kontrolne skupine (str. 60)

**Tablica 6.** Specifični IgE prema *Dp1* u fazi egzacerbacije atopijskog dermatitisa u odnosu na članove kontrolne skupine (str. 61)

**Tablica 7.** Specifični IgE u ispitanika s atopijskim dermatitisom u fazi egzacerbacije i remisije bolesti (str. 62)

**Tablica 8.** Rezultati kožnog testa ubodom u ispitanika s atopijskim dermatitisom i članova kontrolne skupine (str. 63)

**Tablica 9.** Rezultati atopijskog „patch“ testa u ispitanika s atopijskim dermatitisom i članova kontrolne skupine (str. 64)

**Tablica 10.** Rezultati atopijskog „patch“ testa u ispitanika s atopijskim dermatitisom i ispitanika s atopijskim dermatitisom i respiratornim simptomima (str. 65)

**Tablica 11.** Rezultati atopijskog „patch“ testa u ispitanika s atopijskim dermatitisom koji su primali i onih koji nisu primali specifičnu imunoterapiju (str. 66)

**Tablica 12.** Međuodnos kožnog testa ubodom, specifičnog IgE i atopijskog „patch“ testa u ispitanika s atopijskim dermatitisom (str. 67)

### **POPIS KRATICA:**

AD- atopijski dermatitis

ADCC- prema engl. *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*

ADES- prema engl. *Atopic Dermatitis-Eczema Syndrome*

AM- prema engl. *Atopic March*

APCs- prema engl. *Antigen Presenting Cells*

APT- prema engl. *Atopy Patch Test*

BJ- biološka jedinica

C1 INH- inhibitor C1 komponente komplementa

CD- prema engl. *Cluster of Differentiation*

CH- konstantna domena teškog lanca

CL- konstantna domena lakog lanca

C3- komponenta komplementa

CO- ciklooksigenaza

CCR- receptor za kemokine

CSF- prema engl. *Colony-Stimulating Factor*

CC- kemokini

C1 INH- inhibitor C1 komponente komplementa



Dp 1- *Dermatophagoides pteronyssimus* 1

Df 1- *Dermatophagoides farinae* 1

DC- prema engl. *Dendritic Cells*

DSF- prema engl. *Dense Fine-Speckles*

DNA- prema engl. *Deoxyribonucleic Acid*

EAD- prema engl. „Ekstrinsic Atopic Dermatitis“

ECF-A- prema engl. *Eosinophil Chemotacting Factor of Anaphylaxis*

ELISA- prema engl. *Enzim-Linked Sorbent Test*

ER- endoplazmatski retikulum

FcγR II- receptor II za Fc fragment IgG

FcγR III- receptor III za Fc fragment IgG

FcεRI- receptor I za Fc fragment IgE

FcεRII- receptor II za Fc fragment IgE

FLG- prema engl. *Filament-Aggregating Protein*

GM-CSF- prema engl. *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*

G-CSF- prema engl. *Granulocyte Colony Stimulating Factor*

H- prema engl. *Heavy*

H1-4- histaminski receptori (1-4)

HLA- prema engl. *Human Leukocyte Antigen*

IAD- „Intrising Atopic Dermatitis“

IL- interleukini

IgA- imunoglobulin A

IgM- imunoglobulin M

IgD- imunoglobulin D

IgG- imunoglobulin G

IgE- imunoglobulin E

IS- imunološka sinapsa

IgG-S-TS- prema engl. *IgG Short Time Sensitizing*

ICs- prema engl. *Immune Complexes*

IFN- interferon

IR- prema engl. *Index of Reactivity*

J- prema engl. *Joining*

kDa- kilodalton

L- prema engl. *Light*

LLPCs- prema engl. *Long-Lived Plasma Cells*

LT- prema engl. *Leukotriene*

LAF- prema engl. *Lymphocyte-Activating Factor*

LATS- prema engl. *Long-Acting Thyroid Stimulator*

MBCs- prema engl. *Memory B Cells*

MHC- prema engl. *Major Histocompatibility Complex*

MC- prema engl. *Memory Cells*

Mr- relativna molekulska masa

MF- prema engl. *Macrophage*

NKT- prema engl. *Natural Killer T Cells*

NK- prema engl. *Natural Killer*

PG-prostaglandini

PAF- prema engl. *Platelet Activating Factor*

PAMPs- prema engl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PNU- prema engl. *Protein Nitrogen Unit*

RIA- prema engl. *Radioimmunoassay*

RAST- prema engl. *Radioallergosorbent Test*

RIST- prema engl. *Radioimmunosorbent Test*

RS- respiratorni simptomi

SPT-prema engl. *Skin Prick Test*

SIT- prema engl. *Specific Immuno-Therapy*

SC- prema engl. *Secretory Component*

S- Svedbergova jedineica

SRS- A- prema engl. *Slow Reacting Substance of Anaphylaxis*

T-reg- prema engl. *T Regulatory Cells*

TCR- prema engl. *T Cell Receptor*

Th- prema engl. *T helper*

Tc- prema engl. *T Citotoxyc*

TGF- prema engl. *T Growth Factor*

TNF- prema engl. *Tumor Necrosis Factor*

TCGF- prema engl. *T Cell Growth Factor*

TEWL- prema engl. *Transepidermal Water Loss*

VH- varijabilna domena teškog lanca

VL- varijabilna domena lakog lanca

## 1.0. UVOD

Atopija je nasljedna sklonost stvaranju imunoglobulina E (IgE) na alergene na koje većina osoba ne reagira. Bolesti vezane s atopijom nazivamo atopijske bolesti. Tu spadaju: atopijski dermatitis (AD), alergijski rinokonjunktivitis i astma. Jedan od najčešćih alergena okoliša koji izaziva senzibilizaciju u ovih osoba su alergeni prašinskih grinja: *Dermatophagoides pteronyssinus*, odnosno njihova prva skupina alergena (*Dp 1*) i *Dermatophagoides farinae* (*Df 1*). Radom se željelo utvrditi značenje ovog alergena u izazivanju/pogoršanju AD-a.

U procesu reagiranja na ovaj alergen uključena je i humoralna (rana reakcije) i stanična komponenta (kasna reakcija) imunog sustava.

Začetnici i nositelji imunosti staničnog ili humoralnog tipa jesu stanice limfnog i mijeloidnog porijekla. Obje vrste stanica razvile su se iz mezoderma i smještene su uglavnom u specifičnim limfnim organima-tkivima (1). Limfne organe dijelimo na primarne (centralne) i sekundarne (periferne). U primarne limfne organe ubrajamo timus i Fabricijevu burzu u ptica, odnosno burzi ekvivalentan organ u čovjeka. Sekundarne limfne organe čine: limfni čvorovi, slezena te respiratornom i gastrointestinalnom traktu pridruženo limfno tkivo.

## 1.1. LIMFNI SUSTAV

### 1.1.1. Timus

Timus nastaje bilateralno iz 3. i 4. brahijalne vreće i sadrži elemente nastale iz sva tri germinalna sloja (2). U sisavaca smješten je u medijastinumu ispred velikih krvnih žila srca i aortnog luka. Tijekom desetog tjedna gestacije male limfoidne stanice migriraju iz fetalne jetre i koštane srži, formirajući timus. Buduća diferencijacija u korteks i srž završi se 14.-16. tjedna (3). Timus je sastavljen od dva režnja vezana uskim trakastim vezivnim tkivom, koje formira i kapsulu timusa. Podijeljen je na režnjiće koji se sastoje od periferije bogate limfocitima i središnjeg dijela koji je siromašan limfocitima. Timus raste brzo i dostiže

najveću veličinu oko petnaeste godine (4), nakon toga nastaje nagla involucija, pri čemu masno tkivo zamjenjuje najprije koru, a zatim i srž (1).

Timusno epitelijalno tkivo sastavljeno je od: epitelijalnih retikularnih stanica, Hassalovih tjelešaca i epitelijalnih cista. Epitelijalne retikularne stanice zajedno s limfocitima tvore parenhim timusa oblika trodimenzionalne stanične mreže. Hassalova tjelešca su karakteristične zvjezdolike strukture u timusu i nalaze se isključivo u meduli (3) i predstavljaju mjesto odumiranja stanica (1). Medularne epitelijalne stanice formiraju ciste timusa. Uz epitelijalne stanice i limfocite timus sadrži i druge vrste stanica kao što su makrofagi i mioidne stanice (3). Mioidne stanice su zanimljive zbog njihove moguće uloge u patogenezi mijastenije gravis (4). Timus je jedan od centralnih limfnih organa koji imaju značajnu ulogu u celularnoj imunosti generirajući zrele T limfocite (3). Različiti signali od strane epitelijalnih stanica doprinose sazrijevanju T limfocita (4). Timus proizvodi brojne polipeptide koji djeluju unutar timusa i na periferiji s ulogom u aktivaciji i diferencijaciji T limfocita. Najpoznatiji su: timozin (alfa 1 i beta 4), timulin, timopoetin (njegov aktivni pentapeptid TP5) i timostimulin (1). Koncentracija ovih hormona timusa u krvi dostiže maksimalne vrijednosti u pubertetu.

### **1.1.2. Fabricijeva burza**

Fabricijeva burza primarni je organ za dozrijevanje limfocita B u ptica. To je gastrointestinalnom traktu pridruženo limfno tkivo vezano s kloakalnim lumenom uskim burzalnim kanalićem (5). Ima oblik vreće čija šupljina spojena je sa šupljinom crijeva. Osnovna građa burze slična je građi timusa. Fabricijeva bursa vjerovatno je glavni kanal putem kojeg antigeni okoliša stimuliraju imuni sustav (5). U sisavaca nije poznat organ koji bi po funkciji odgovarao Fabricijevoj burzi. Smatra se da je to sama koštana srž, a u ranom intrauterinom razvoju tu ulogu ima fetalna jetra, a možda i slezena (1). Koštana srž je od

primarne važnosti za razvoj limfnog sustava jer je izvor stanica matica, iz kojih nastaju limfne i fagocitne stanice. Stromalne stanice tvore mrežu u intersinusoidnim prostorima koštane šupljine (6), u kojima hematopoetske stanice diferenciraju se i proliferiraju. Jedna od glavnih funkcija stromalnih stanica je produkcija IL-7 koji je neophodan u sazrijevanju B limfocita (6).

### **1.1.3. Limfni čvor**

To je ovalni ili okrugli organ smješten pojedinačno ili u nakupinama duž limfnih žila. Sastoji se iz tri dijela: korteksa, parakorteksa i medule (7). Ima tri glavne funkcionalne zone ili područja koja podržavaju različite imune funkcije (8). Kortikalno područje je sastavljeno pretežno od B-limfocita, parakortikalno područje bogato je T-limfocitima i medula sa sinusoidima i medularnim trakama, sastavljena je pretežno od plazma stanica i makrofaga (8). Nakupine limfocita u vanjskom dijelu kore limfnog čvora nazivamo limfnim čvorićima ili folikulima. To su bazične anatomske i funkcionalne jedinice limfnog čvora. Limfa prolazi izravno kroz limfni čvor koji djeluju kao filter za antigene koji dolaze limfnim putem (1). Limfociti kontinuirano recirkuliraju, ulazeći u limfni čvorić parakortikalnim sinusima (7), zatim napuštaju limfni čvor i vraćaju se u cirkulaciju putem *ductus thoracicus*-a. Primarni čvorići sastoje se od gusto zbijenih malih limfocita i germinativnog centra s B limfocitima koji se intenzivno dijele nakon kontakta s antigenom (1). Sekundarni čvorići su nakupine limfocita bez germinativnog centra odnosno zametnog središta. T i B limfociti u limfnom čvoru nalaze se u odijeljenim područjima, tako da područje stanica T su parakortikalna regija, a područje B limfocita limfni čvorići (1).

### **1.1.4. Slezena i drugi limfni organi**

Slezena je najveći sekundarni imuni organ u tijelu i ima ulogu u imunim reakcijama prema krvlju donešenim antigenima, filtriranju krvi od stranih tvari i u uklanjanju starih ili oštećenih eritrocita (9). Okružena je kapsulom koja je sastavljena od čvrstog fibroznog tkiva,

elastičnih vlakana i glatke muskulature. Slezena ima dva funkcionalno i morfološki različita dijela; crvenu i bijelu pulpu. Crvenu pulpu čini trodimenzionalna mreža tračaka i venskih sinusa (9). To je krvni filter koji odstranjuje strane tvari, istrošene i oštećene eritrocite. Bijela pulpa građena je od limfocita, makrofaga, dendritičnih i plazma stanica, arteriola i kapilara (10). Primarni limfni čvorići nalaze se prema periferiji bijele pulpe, obično na strani suprotnoj od centralne arterije. Krv dolazi u bijelu pulpu centralnom arterijom, a dijelom završava u kanalu koji okružuje bijelu pulpu koji nazivamo i marginalni sinus. Područje T limfocita je oko centralne arterije, dok područje B limfocita je uz vanjski rub bijele pulpe oko limfnih čvorića i sami čvorići (1).

Oko polovice broja limfocita imunskog sustava nalaze se u limfnom tkivu pridruženog mukozama. Ovo tkivo je neinkapsulirano i smješteno je u stijenci probavnog sustava (1), nasofarinksa, bronha, a ponekad konjunktive, suznog kanalića i kanalića žlijezda slinovnica (11). Stanične komponente mukozama pridruženog limfnog tkiva su B limfociti, CD4+, CD8+ stanice, antigen prezentirajuće dendritične stanice, makrofazi, a često mastociti i eozinofili (11). Dio ovog limfnog tkiva je relativno dobro organiziran kao što su tonsile u nazofarinksu i Peyerove ploče u submukozi tankog crijeva. One također sadrže limfne čvoriće, a oko 50% limfocita B u tim čvorićima sintetizira IgA (1). U jetri se nalaze makrofazi (Kupfferove stanice) koje odstranjuju antigene iz krvi, a makrofazi u alveolama pluća istu ulogu imaju za antigene koji dolaze dišnim putem.

## **1.2. IMUNOKOMPETENTNE STANICE**

Stanice koje sudjeluju u imunološkoj reakciji nastaju iz pluripotentnih hematopoetskih stanica-matica tijekom dva puta diferencijacije: a) limfopoezom, pri čemu nastaju limfne stanice (limfociti), b) mijelopoezom, pri čemu nastaju fagocitne i medijatorske stanice, koje se nazivaju i akcesornim imunološkim stanicama (1). Limfne stanice su najvažnije stanice

imunskog sustava jer su nosioci svih vrsta specifične imunosti, a svojim limfokinima aktiviraju i pojačavaju mehanizme nespecifične imunosti. Fagocitne stanice predstavljaju komponentu urođenog imunog sustava i zadaća im je fagocitoza patogenih tvari. Najznačajnije fagocitne stanice su: makrofazi, monociti, eozinofili, neutrofil, dendritične stanice te neke stanice retikuloendotelnog sustava (npr. Kupfferove stanice u jetri). Makrofazi zajedno s dendritičnim stanicama predstavljaju sponu između urođenog i stečenog imunog sustava (12). Stečeni imuni sustav sastavljen je od celularne komponente koja je pretežno posredovana T stanicama i humoralne koja je posredovana B stanicama. Hematopoetske stanice-matice (engl. „*stem-cells*“) u koštanoj srži, odgovorne su za dugotrajnu produkciju stanica krvi, uključujući T i B limfocite (13). Proces sazrijevanja odvija se u fetalnoj jetri i koštanoj srži, s tim da B limfociti potpuno dozrijevaju u koštanoj srži, a T limfociti moraju putovati do timusa gdje potpuno sazrijevaju (14). Sazrijevanje T limfocita omogućeno je međusobnom interakcijom stromalnih stanica i T limfocita. Timus omogućuje diferencijaciju više različitih staničnih subtipova, kao što su: CD4 i CD8  $\alpha/\beta$ ,  $\gamma/\delta$  T stanica, NKT stanica, regulatornih T stanica (T-reg) i intraepitelijalnih limfocita. Ove stanice moraju napustiti timus da bi obavljale svoju funkciju (15).

### **1.2.1. T limfociti**

Tijekom sazrijevanja u timusu, nezrele progenitorske stanice prolaze čitav niz diferencijacijskih dioba, pri čemu u posljednjoj fazi razvoja stječu značajke imunokompetentnih limfocita tj. zadobiju funkcionalan antigen specifičan receptor, izražavaju površinske biljege zrelih limfocita, mogu reagirati na antigen i postati završne efektorske stanice (1). T stanice imaju efektorske, ali i regulacijske funkcije u imunološkoj reakciji. U efektorske funkcije ubrajamo reakcije poput kasne preosjetljivosti, odbacivanje alotransplantata, imunost na tumore i reakciju transplantata protiv primaoca.



Regulacijske funkcije T stanica ogledaju se kroz pojačanje citotoksičnosti posredovane drugim T stanicama i stvaranju imunoglobulina od strane B limfocita. T limfocitni receptor je heterodimer sastavljen od dva lanca vezana s disulfidnim vezama i oba lanca sastavni su dio proteina membrane koji se s 4-5 aminokiselina proteže u citoplazmu (16). U ljudi, a i u većine životinja, najveći broj T stanica ima T stanični receptor (TCR, prema engl. „*T Cell Receptor*“) sastavljen od  $\alpha$  lanca i  $\beta$  lanca, dok manja populacija T limfocita ima TCR sastavljen od  $\gamma/\delta$  lanaca (17). T limfociti aktiviraju se kad njihov TCR prepozna spoj formiran od antigenog peptida s molekulom glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (HLA, prema engl. „*Human Leukocyte Antigen*“) smještenog na površini antigen prezentirajuće stanice (APC, prema engl. „*Antigen Presenting Cells*“) (18). Prepoznavanje spoja T stanicama pokreće kaskadu signala koji dovode do različitih funkcija limfocita kao što su: proliferacija, produkcija citokina, a u slučaju T citotoksičnih limfocita ubijanje ciljne stanice (19). Noviformiranu strukturu na sučelju APC i T stanice nazivamo „imunološka sinapsa“ (IS) (20). Unutar zrele sinapse T stanični receptor zauzima središnji dio nazvan „*središnji supramolekularni aktivirajući kompleks*“ (21), s integrinima i drugim molekulima na periferiji zone (22). Th1 i Th2 limfociti pokazuju razlike u formiranju imunološke sinapse. Th1 formiraju tipičnu IS s prstenom adhezivnih molekula oko TCR/MHC spoja u svim koncentracijama alergena, a Th2 stanice, u visokoj koncentraciji alergena, formiraju multifokalne IS-e (23). Prepoznavanje spoja antigenog peptida i HLA molekule dovodi do prestanka kretanja T stanice i povećanja stabilnosti kontakta s odgovarajućom APC (24). Gibanje T limfocita i njihovi dodiri s drugim stanicama odvijaju se pomoću molekula koje nisu specifične za antigen, a zovu se adhezijske molekule i to su: selektini, vaskularni adresini, integrini i velika imunoglobulinska obitelj molekula (25). Integrini usmjeravaju stanice tijekom diferencijacije, povezuju stanice međusobno i s izvanstaničnim matriksom (25).

Za potpunu aktivaciju T limfocita neophodna su tri signala. Prvi signal nastaje vezivanjem receptora na limfocitu T za kompleks antigena MHC skupine II i prerađenog tuđeg antigena na antigen prezentirajućoj stanici (25). Drugi signal je sadržan u dodiru molekule B7 na antigen prezentirajućoj stanici i molekule CD 28 na limfocitu T. Treći signal je od citokina IL-12, interferona  $\alpha$  ili  $\beta$  ili adjuvanta i najveći mu je značaj pri maloj količini antigena (26).

Zreli T limfociti ispoljavaju CD4 ili CD8 molekule što nam koristi u prepoznavanju CD4+ pomagačke stanice (Th, prema engl. "*Helper*") i CD8+ citotoksične stanice (Tc, prema engl. "*cytotoxic*") (27). Aktivirane CD8+ stanice mogu se diferencirati u tip 1 (Tc1) stanice koje produciraju velike količine IFN- $\gamma$  ili u tip 2 (Tc2) stanice koje uglavnom produciraju IL-4, IL-5, IL-10 i TGF- $\beta$  (28). Tc1 stanice sekrecijom IFN- $\gamma$  ubijaju ciljane stanice i predstavljaju glavni mehanizam obrane protiv tumora i virusom inficiranih stanica, dok značaj Tc2 stanica u imunom odgovoru je nepoznat. S funkcionalnog aspekta Th mogu biti podijeljeni u CD4+ regulatorne stanice (T-reg), koje pokazuju imunosupresivnu aktivnost i u CD4+ T efektorske stanice koje se bore protiv infektivnih agenasa (29). Postoje dvije glavne subpopulacije regulatornih T limfocita: prirodni regulatorni T limfociti koji nastaju u timusu i inducirane T-reg stanice koje nastaju na periferiji nakon kontakta s alergenom i djeluju putem citokina (IL-10 i TGF- $\beta$ ) (30). T-reg su CD4+ CD25+ stanice i neophodne su u aktivnoj supresiji autoimunosti (31). U novije vrijeme otkrivena je nova vrsta efektorskih CD 4+ stanica koje ne spadaju u Th1 ili Th2 stanice (29). Ove stanice su nazvane Th 17 i proizvode proinflamatorne citokine, skupine od šest IL-17 (IL-17A-IL-17F) (32). CD4+ efektorske stanice, proizvode različite citokine, i prema toj produkciji mogu se podijeliti na Th1 i Th2 stanice. Th1 limfociti proizvode interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), limfotoksin i tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), dok Th2 stanice proizvode IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-12 (33). Diferencijacija djevičanskih T stanica u Th1 ili Th2 događa se tijekom njihovog sazrijevanja

i pod utjecajem je dendritičnih stanica (DC, engl. „*Dendritic Cells*“) (29) i prisustvu odnosno odsustvu patogena.

### **1.2.2. B limfociti**

B limfociti nastaju u jetri tijekom fetalnog života i u koštanoj srži nakon rođenja.

Iz koštane srži stanice odlaze na periferiju i pune sekundarne limfne organe te postaju prijelazni oblici B limfocita (34). Samo zreli B limfociti ulaze u limfne folikule, tvore germinativni centar i učestvuju u imunom odgovoru (35). B stanični receptor je kompleks sastavljen od specifičnog i nespecifičnog dijela. Specifičnim dijelom limfocit B prepoznaje antigen i čini ga monomer imunoglobulina koji je u dječičanskim limfocitima monomer IgM i IgD (1). Nakon stimulacije antigenom nestaje IgD, nastaje gensko prekapčanje i na stanici se pojavljuje najčešće monomer IgG, ali i monomeri IgA ili IgE (1). Građa tih imunoglobulina jednaka je građi slobodnih protutijela koja će ta stanica secernirati, s izuzetkom konstantne domene (C3 ili C4) kojom je monomer vezan za staničnu membranu. Specifični dio veže strani antigen, a nespecifični dio služi za prijenos signala i čine ga dva para heterolognih polipeptida Ig- $\alpha$  i Ig- $\beta$  (36). Za optimalnu aktivaciju B limfocita neophodni su signali nastali prepoznavanjem stranog antigena B staničnim receptorom kao i dodatni signali nastali interakcijom s Th stanicama, uključujući interakciju CD40-CD154 (37). Plazma stanice zadnji su oblik funkcionalne diferencijacije B limfocita nakon kontakta s antigenom i odgovorne su za produkciju protutijela. B-limfocite možemo podijeliti u B-1 i B-2 stanice (38). B-1 stanice mogu se podijeliti na B-1a koje izražavaju molekulu CD5 i B-1b koje je ne izražavaju (39). Limfociti B-1 čine minornu populaciju u organiziranim perifernim limfnim organima, sazrijevaju prije stanica B-2 i stvaraju se u fetalnoj jetri, dok stanice B-2 nastaju uglavnom u koštanoj srži (1). One imaju i različitu ulogu u imunološkoj reakciji, izgleda da su B-2 stanice odgovorne za T-limfocit ovisne egzogene antigene i za stvaranje B stanica pamćenja (MC,

prema engl. „*Memory Cells*“ (40). Pored primarne uloge B limfocita u stvaranju protutijela oni imaju ulogu i kao antigen prezentirajuće stanice.

### 1.2.3. Limfociti 0

Za razliku od limfocita T i B, limfociti 0 nemaju klonotipski receptor, a time ni mogućnost specifičnog prepoznavanja antigena (1). Tu spadaju urođenoubilačke stanice NK stanice (NK, prema engl. „*Natural Killer*“ i one predstavljaju komponentu nespecifičnog imunog sustava protiv virusa i bakterija (41), a imaju ulogu i u imunom odgovoru na unutarstanične patogene i upali tkiva pri autoimunim bolestima (42). NK stanice veliki su limfociti s granuliranom citoplazmom i površinskim biljezima CD16 i CD56 (43). Nastaju i sazrijevaju u koštanoj srži (42). Nalaze se u svim perifernim limfatičnim organima osobito u slezeni, a u krvi čine oko 5% limfocita (1). Urođenoubilačke T stanice (NKT) su posebna podvrsta T limfocita za koju je značajno da izražava biljege NK stanica i nepromjenljivi  $\alpha$  lanac T staničnog receptora (42). Nastaju u timusu, jedinstvena su podvrsta limfocita koja spaja urođenu i stečenu imunost, a imaju i efektorsku i regulatornu ulogu u imunom odgovoru (44). Dva su načina na koji NK stanice mogu ubiti ciljnu stanicu. Prvo, pomoću molekule Fc $\gamma$ RIII-A (CD16) vežu se za ciljnu stanicu obloženu protutijelima, što pokreće otpuštanje citotoksičnih granula i ubijanje ciljne stanice (tzv. citotoksičnost ovisna o protutijelima; ADCC, prema engl. „*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*“ (1). U drugom slučaju ispoljavaju svoju urođenoubilačku aktivnost (NK aktivnost; prema engl. „*Natural Killer Activity*“) lizirajući ciljnu stanicu, lučenjem sadržaja citoplazmatskih granula na mjestu kontakta s ciljnom stanicom (45). Prema gustoći površinskih CD56 biljega, ljudske NK stanice možemo podijeliti na dvije različite skupine, kao što su CD56<sup>dim</sup> (tamne) i CD56<sup>bright</sup> (svijetle) (46). CD56<sup>dim</sup> efektorske funkcije ispoljavaju putem perforina i granzima (41) dok su CD56<sup>bright</sup> stanice uključene u regulaciju imunog odgovora sekrecijom niza citokina, kao

što su: IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , IL-10, IL-13 i GM-CSF (prema engl. „*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulator Factor*“) (47)

#### **1.2.4. Stanice s pamćenjem**

Imuni odgovori na infektivne agense praćeni su dugotrajnom memorijom, tijekom koje ponovni kontakt s antigenom dovodi do uspješnog odgovora i brzog uništenja patogena (48). Stanice s pamćenjem (MC, prema engl. „*Memory Cells*“) specijalizirane su T- ili B- stanice nastale tijekom primarnog imunog odgovora prema stranom antigenu i omogućuju brzi imunološki odgovor nakon izlaganja istom antigenu (49). Dugotrajna proizvodnja protutijela godinama nakon infekcije ili cijepljenja pruža prvu liniju obrane protiv patogena i ključna je u humoralnoj obrani (50). Pored postojećih protutijela, B stanice s pamćenjem mogu biti mirujuće B stanice s pamćenjem (MBCs prema engl. „*Memory B Cells*“) i dugoživuće stanice koje proizvode protutijela (LLPCs, prema engl. „*Long-Lived Plasma Cells*“)(49,50). Antigen specifične MBCs primarno su smještene u sekundarnim limfnim organima, ne proizvode aktivno protutijela, ali ispoljavaju B stanični receptor jaćeg afiniteta (50). Dugoživuće plazma stanice koje proizvode protutijela smještene su u koštanoj srži i konstantno proizvode i luće protutijela (50). Za T stanice s memorijom postoje dva podtipa koji su identificirani različitim izražavanjem receptora za kemokine (CCR7); T stanice s centralnom memorijom izražavaju CCR7, dok efektorske stanice s memorijom ne ispoljavaju CCR7 (51). U mnogim slučajevima stanice s memorijom luće citokine brže i u većoj kolićini, a trebaju manju antigensku stimulaciju nego djevićanske stanice (48).

### **1.3. FAGOCITNE I ANTIGEN PREZENTIRAJUĆE STANICE**

Endocitoza je uzimanje tekućih (pinocitoza) ili krutih tvari (fagocitoza) iz okoliša u citoplazmu. Fagocitoza zapoćinje vezivanjem strane tvari za receptore na stanićnoj površini. Ingestijom stranog agensa ili apoptotićne stanice nastaje fagosom ćijim spajanjem s

lizozomima nastaje fagolizozom, koji je ključan u enzimskoj digestiji ingestiranog sadržaja (52). Fagosomi u makrofaga nastaju direktnim spajanjem endoplazmatskog retikuluma (ER) i plazma membrane u početku fagocitoze, dok u neutrofila ER nije glavni izvor membrana za fagosome. Na površini fagocita nalaze se brojni receptori koji su sposobni da prepoznaju strane antigene ili apoptotične stanice te ih fagocitiraju (52). Receptori pokreću proces fagocitoze i određuju posljedice fagocitoze, koje mogu biti proinflamatorne ili antiinflamatorne (52). Među fagocitne stanice spadaju u prvom redu monociti-makrofazi i srodne stanice mononuklearnog fagocitnog sustava kao što su: Kupfferove stanice u jetri, mezengijalne stanice u bubregu, mikroglia u mozgu, ali i neutrofilni leukociti i druge stanice polimorfonuklearnog fagocitnog sustava (1). Fagociti imaju receptore za Fc fragment imunoglobulina i C3 komponentu komplekta što im pojačava fagocitnu aktivnost. Pojačanje fagocitoze čestica obloženih protutijelima naziva se imunološka ili olakšana fagocitoza, a adheriranje fagocitne stanice na stanične antigene koji su obloženi s ulomcima komplekta nazivamo imunoaderencija (1). U sisavaca profesionalni fagociti makrofazi, dendritične stanice i granulociti nastaju iz zajedničke mijeloidne progenitorske stanice (52).

### **1.3.1. Antigen prezentirajuće stanice**

Antigen prezentirajuće stanice (APC, prema engl. „*Antigen Presenting Cells*“) obuhvaćaju veliku skupinu različitih stanica koje su prisutne u tijelu na različitim anatomskim mjestima. Sposobne su razgraditi antigen, prezentirati ga na svojoj površini T- i B stanicama i pokrenuti imuni odgovor (53). Mogu se podijeliti na profesionalne i neprofesionalne antigen prezentirajuće stanice, ovisno o njihovom potencijalu za prezentiranje antigena T stanicama. Profesionalne antigen prezentirajuće stanice makrofazi i dendritične stanice porijeklom su iz koštane srži i mogu dodatno stimulirati imunski sustav molekulima B7-1 i B7-2 (54). Aktivirane stanice epitelijalnog porijekla mogu biti neprofesionalne antigen prezentirajuće stanice (54). Inicijalni signali nekih APC ne dovode do

aktivacije djevičanskih T limfocita nego do antigen-specifične tolerancije na strane i vlastite antigene (55).

### **1.3.2. Dendritične stanice**

Dendritične stanice (DCs, prema engl. „*Dendritic Cells*“) specijalizirane su stanice nastale iz leukocita koštane srži i ključne su u pojavi imunosti (53). One su heterogena skupina stanica koja je nastala iz različitih hematopoetskih linija koštane srži. U ljudi imaju dva glavna podtipa DCs i to su mijeloidne DCs (DC1) i plazmacitoidne DC (DC2) (56). Sazrijevanje mijeloidnih DCs i monocitno-makrofagnih stanica u bliskoj su vezi (57). Postoje dvije populacije mijeloidnih dendritičnih stanica: Langerhansove stanice i upalne dendritične epidermalne stanice (58). U AD-u oba tipa stanica ispoljavaju receptore za IgE visokog afiniteta (FcεRI). Langerhansove stanice pojavljuju se u normalnoj koži, a upalne dendritične epidermalne stanice pojavljuju se samo u upaljenoj koži (59). Plazmacitoidne DCs nastaju od progenitora od kojih nastaju T i NK-stanice (60). Mijeloidne DCs naseljavaju periferna tkiva, a fagocitiraju i razgrađuju antigen prije migriranja u sekundarna limfna tkiva. Plazmacitoidne DCs uključene su u prezentiranje vlastitih antigena sazrijevajućim timocitima i odbacivanju autoreaktivnih T stanica. DCs nalaze se unutar većine tkiva, a ne nalaze se u središnjem živčanom sustavu i rožnici. Za obavljanje imunološke uloge koriste fagocitozu, pinocitozu i specifične receptore za hvatanje mikrobnih patogena, mrtvih ili umirućih stanica, imunih kompleksa i drugih antigena (53)

### **1.3.3. Makrofazi/monociti**

Makrofazi su heterogena populacija stanica prisutna u različitim tkivima i organima i odgovorni su za mnoga metabolička, imunološka i upalna događanja u fiziološkim i patološkim stanjima (61). Mononuklearni fagocitni sustav sastoji se od stanica koje su nastale iz progenitorske stanice koštane srži (62). Mijeloidne progenitorske stanice diferenciraju se u monocite koji ulaze u cirkulaciju i migriraju u različita tkiva, gdje se

diferenciraju u makrofage (63). Izgleda da neke subpopulacije monocita mogu diferencirati se u različite tipove makrofaga, ovisno o tkivnom okolišu i prisutnim patogenima (64). Makrofazi izražavaju mnoge receptore koji posreduju u različitim funkcijama. Opsonični receptori obuhvaćaju receptore za komponente komplementa i receptore za Fc ulomak imunoglobulina (65). Njihova uloga je fagocitoza komplementom ili protutijelima obloženih partikula. U kontaktu s nekim agensima kao što su mikroorganizmi, antigeni ili aktivirani T-limfociti, MF postaju veći, pojačan im je metabolizam, povećava se količina lizozoma i proteolitičkih enzima, bolje fagocitiraju i pojačano izražavaju molekule MHC i kostimulacijske molekule (1). Takvi makrofagi označavaju se kao aktivirani i ta aktivacija nije specifična za antigen. Kao antigen prezentirajuće stanice predočuju antigen limfocitima i izlučuju supstancije koje pospješuju reakcije limfocita, zbog čega su važni u početnim fazama specifične humoralne i celularne imunosne reakcije (1).

#### **1.3.4. Neutrofilni leukociti**

Neutrofilni leukociti fagocitne su stanice koje se nalaze u krvi i mnogobrojnim tkivnim prostorima, a nastaju iz pluripotentne matične stanice u koštanoj srži. Podijeljeni su na cirkulirajući dio, prisutan u velikim krvnim žilama i središnjoj struji malih krvnih žilica i na marginalni dio koji je priljubljen uz stijenku krvne žile. U upalnoj reakciji topljivi medijatori aktiviraju leukocite i endotelne stanice, a interakcija s adhezivnim molekulima i selektinima neophodna je za kretanje i ulazak leukocita u tkiva (66). Glavna uloga neutrofila je fagocitoza i najbolje su opremljeni za fagocitozu mikroorganizama (1). Imaju receptore za Fc fragment imunoglobulina G (FcγRII i FcγRIII) i za ulomak C3b komponente komplementa (CR1, CR3 i CR4) pa su opremljeni i za specifičnu imunološku fagocitozu (1). Funkcionalni fagocitni receptori su FcγRII i CR3, dok se CR1 i FcγRIII najčešće pojavljuju kao koreceptorske molekule koje pojačavaju ulogu prethodnih (67). Zreli neutrofilni leukociti sadrže u citoplazmi najmanje četiri različite vrste granula (68). To su primarne, sekundarne, tercijarne



granule i sekretorne vezikule (68). Primarne (ili azurofilne) granule sadrže mijeloperoksidaze, serin proteaze i antibiotske proteine (69). Sekundarne ili specifične granule sadrže laktoferin, alkalnu fosfatazu, aminopeptidazu i lizozim (1). Tercijarne granule sadrže želatinaze, a sekretorne vezikule sadrže plazma proteine kao što su albumini (67). Aktivirani neutrofili izlučuju u okolinu različite proteolitičke enzime i vazoaktivne tvari pa to pridonosi razvoju reakcija rane preosjetljivosti (1).

### **1.3.5. Eozinofilni leukociti**

Eozinofilni leukociti nastaju u koštanoj srži od CD34+ progenitorske stanice utjecajem citokina IL-5 (70). U krvi borave nekoliko sati i utjecajem kemotaktičkih podražaja prelaze u tkiva (1). Nakupljanje eozinofila kao i bazofila u tkivima posredovano je međuodnosom adhezivnih molekula, kemokina i kemoatraktanata. U prvo vrijeme su smatrane stanicama s ulogom u zaštiti od parazita, a sada se smatra da su to multifunkcionalni leukociti s ulogom u započinjanju i širenju različitih upalnih procesa i modeliranju urođene i stečene imunosti (71). Granule eozinofila sadrže mnoge faktore (eozinofilne peroksidaze, glavni bazični protein, eozinofilni neurotoksin), koji primarno djeluju kao citokini, dok eozinofilni kationski protein i eozinofilni neurotoksin djeluju kao ribonukleaze (30). Sposobnost fagocitoze i intracelularnog ubijanja mikroorganizama znatno je slabija u eozinofila nego u neutrofila, međutim oni vrlo dobro upijaju komplekse antigena i protutijela jer imaju receptore za Fc fragment IgG i IgE, pa misli se da su važni pri uklanjanju tih kompleksa iz tijela (1). Eozinofili adheriraju za nametnike, koji su obloženi protutijelima (IgG ili IgE) ili ulomcima C3 komponente komplementa i potom luče glavni kationski protein, eozinofilni kationski protein i druge tvari koje razaraju membrane parazita (1).

## 1.4. MEDIJATORSKE STANICE

Medijatorske stanice tijekom imunološke reakcije izlučuju kemijske tvari-medijatore alergijskih reakcija, koji ispoljavaju različita biološka djelovanja. Među medijatorske stanice spadaju u prvom redu bazofilni leukociti, mastociti, krvne pločice, ali se mogu ubrojiti i neke od fagocitnih stanica (neutrofili, eozinofili).

### 1.4.1. Mastociti

Mastociti su jedne od prvih stanica koje u ranoj fazi alergijske upale dolaze u kontakt s potencijalnim alergenima. To su centralne efektorske stanice koje izazivaju ranu i kasnu fazu IgE posredovane alergijske upalne reakcije (72). Nastaju, kao i drugi leukociti, iz hematopoetske „stem“ stanice, ne sazrijevaju prije napuštanja koštane srži i cirkuliraju kao progenitorske stanice, a u nedostatku upalne reakcije ne sazrijevaju u zrele mastocite (73). Nađeni su u svim organima i vaskulariziranim tkivima, gdje nakon interakcije antigena, IgE i FcεRI, otpuštaju sadržaj svojih granula s preformiranim faktorima (histamin, neutralne proteaze, citokini, proteoglikani) i počinju sintezu drugih faktora (prostaglandina D, leukotriena B<sub>4</sub> i C<sub>4</sub>, citokina, kemokina) (30). Oslobođanjem ovih medijatora dolazi do dilatacije krvnih žila, povećane propusnosti kapilara, a lučenjem kemotaktičnih faktora omogućuje se nakupljanje neutrofilnih leukocita i plazmatskih obrambenih faktora na mjesto patogena (1). Pored navedene sekretorne uloge mastociti izražavaju cijeli spektar površinskih receptora što im omogućuje davanje kostimulatornih signala tijekom urođene i stečene imunosti (74). Na površini izražavaju molekule MHC klase I i II, intercelularne adhesivne molekule 1, B7, β2 integrine, CD40L i Toll-like receptore što im omogućuje interakciju s drugim upalnim stanicama i mikroorganizmima tijekom imunog odgovora (75). Mastociti se mogu podijeliti u dvije subpopulacije, mukozni mastociti i mastociti vezivnog tkiva (73). Prema sadržaju proteaza mogu se podijeliti na tri podvrste, a to su: triptaza+/kimaza +, triptaza +/kimaza – i triptaza-/kimaza+.

### **1.4.2. Bazofilni leukociti**

To je mala populacija perifernih leukocita krvi koji sadrže citoplazmatske granule koje se boje bazofilnim bojama. Bazofili, kao i mastociti, monociti, eozinofili i neutrofilni, nastaju iz CD34 + progenitorske stanice koja je nađena u pupkovini, perifernoj krvi i koštanoj srži (76). Za razliku od mastocita koji sazrijevaju u perifernim tkivima, zreli bazofili su nađeni u cirkulaciji, gdje čine manje od 1% cirkulirajućih leukocita (76). I bazofili posjeduju receptor za IgE visokog afiniteta (FcεRI) i granule koje sadrže histamin, što ih čini sličnim s mastocitima (77). Kao mastociti, i bazofili nakon premošćenja IgE molekula antigenom otpuštaju brojne medijatore koji su dijelom isti kao i u mastocita (76). Bazofili mogu biti aktivirani, parazitima, lektinima i virusnim superantigenima. Za razliku od mastocita bazofili luče i IL-4, koji je bitan u procesu sazrijevanja Th2 limfocita (77). Bazofili su ključne efektorske stanice u Th2 tipu imunog odgovora i alergijskoj upali (78). Imaju sposobnost kontinuirane produkcije LTC4 i citokina (IL-4 i IL-13) te mogu biti značajni u kroničnim alergijskim bolestima, kao što je astma (76).

### **1.4.3. Trombociti**

Trombociti (krvne pločice) nastaju iz megakariocita u koštanoj srži s primarnom ulogom u hemostazi, ali igraju ulogu i u imunološkim reakcijama, otpuštajući vazoaktivne amine koji se nalaze u citoplazmatskim granulama (1). Ove stanice izražavaju funkcionalne receptore za Fc fragment IgE slabog (FcεRII) i jakog afiniteta (FcεRI), stoga su sposobne otpuštati različite upalne medijatore tijekom antigen-specifične aktivacije ovih receptora (79). Od važnijih medijatora koje otpuštaju su histamin, serotonin i faktori koji aktiviraju komplement (1). Ostale supstancije koje otpuštaju tijekom alergijskih reakcija nastaju metabolizmom arahidonske kiseline i fosfolipida i stvaraju se nakon aktivacije različitim upalnim stimulansima (80)

## 1.5. MEDIJATORI ALERGIJSKIH REAKCIJA

Vezivanjem alergena za molekule IgE, smještenih najčešće na mastocitima i bazofilima, dolazi do niza reakcija koje u konačnici dovode do oslobađanja upalnih medijatora kao što su: histamin, prostagladini i leukotrieni koji ispoljavaju svoje farmakološke efekte. Primarni medijatori se stvaraju i pohranjuju u zrcima te se opisanim procesom degranulacije oslobađaju, dok sekundarni medijatori počinju se stvarati nakon premošćenja molekula IgE. Primarna uloga medijatora alergijskih reakcija izgleda da je zacjeljivanje rana od povrede najprije uzrokovanjem upalne reakcije, a potom stimuliranjem regeneracije tkiva. Čini se da histamin ima ulogu pri kontroli mikrocirkulacije na kapilarnoj razini, gdje postoji homeostatska ravnoteža između konstrikcije kapilara uzrokovane epinefrinom i dilatacije kapilara uzrokovane histaminom (81).

**Histamin** pripada bioaktivnim aminima (Mr:111) i sintetizira se dekarboksilacijom L-histidina u Golgi aparatu (82). Sintetiziraju ga mastociti, bazofili, histaminogeni neuroni i enterokromafine stanice. Pohranjuje se u intracelularnim vezikulama te otpušta nakon odgovarajuće stimulacije (82). To je jak medijator brojnih alergijskih reakcija i uzrokuje kontrakciju glatke muskulature bronhiola, pojačanu propusnost kapilara i pojačanu sekreciju mukoznih žlijezda u nosu i bronhima (81). Po oslobađanju djeluje oko desetak minuta, a razgrađuju ga dva različita inaktivaciona mehanizma: metilacija N-metil-transferazom koja je ubikvitarna i oksidacija diamino-oksidadom koja se uglavnom nalazi na periferiji (83), a oko 2-3% izluči se nepromijenjeno. Mnogobrojna djelovanja histamina na ciljne stanice posredovana su specifičnim površinskim receptorima na ciljnim stanicama. Do sada su potvrđene četiri vrste farmakološki različitih histaminskih receptora (82), koji su označeni kao H1, H2, H3 i H4 (83). Vezivanje histamina za H1 receptore dovodi do kontrakcije crijevnih i bronhalnih glatkih mišića i povećanja propusnosti kapilara. H1 receptori nalaze se u različitim tkivima kao što su: centralni živčani sustav, glatka muskulatura, gastrointestinalni trakt,

kardiovaskularni sustav, endotelijalne stanice i limfociti (84). Tipične alergijske reakcije tipa I kao što su crvenilo, svrbež i otok uglavnom uzrokovane su aktivacijom H1 receptora (83). Rinitis, astma, anafilaksija i urtikarija posljedica su periferne stimulacije H1 receptora (83). Histaminski H2 receptori nađeni su u različitim tkivima kao što su mozak, želučane parijetalne stanice i tkivo srca. Stimulacija ovih receptora može dovesti do pozitivnog inotropnog i kronotropnog efekta na atrijalno i ventrikularno tkivo, ali najznačajniji efekt je stimulacija gastične sekrecije. Dendritične stanice koje sazrijevaju u prisustvu histamina usmjeravaju djevičanske CD4+ T stanice prema Th2 fenotipu, u odnosu na one koje sazrijevaju bez prisustva histamina (82).

H3 receptori primarno su smješteni u centralnom živčanom sustavu većim dijelom u bazalnim ganglijama, hipokampusu i korpus striatumu dok se na periferiji mogu se naći u manjem broju u gastrointestinalnom traktu, bronhijama i kardiovaskularnom sustavu (83). U ljudi nađeno je više isoformi ovih receptora u različitim dijelovima mozga (82). Lokalizirani su presinaptički i djeluju kao autoreceptori kontrolirajući sintezu i otpuštanje histamina negativnom povratnom spregom. Histaminski H4 receptori su jako bliski s H3 receptorima. Nađeni su u koštanoj srži i leukocitima, osobito u eozinofilima, mastocitima, dendritičnim stanicama, bazofilima, T limfocitima, a u manjem broju u slezeni i intestinalnom traktu (83).

**Serotonin** (5-hidroksitriptamin) se nalazi u mastocitima štakora i miša i u ljudskim trombocitima. U čovjeka nema značaja tijekom anafikatičke reakcije.

**Leukotrieni** (LT ili tvar sporog djelovanja-SRS-A; prema engl. "*Slow Reacting Substance of Anaphylaxis*") i prostaglandini (PG) su proinflatorni medijatori koji nastaju konverzijom arahidonske kiseline lipooksigenaznim ili ciklooksigenaznim putem. Za razliku od histamina LT nisu preformirani u stanicama, prije antigene stimulacije u stanicama ih nema ili ih ima malo. LT uzrokuju dugotrajnu kontrakciju glatkih mišića i imaju ulogu u patogenezi bronhalne astme u ljudi. Prema kemijskim i biološkim svojstvima LT

mogu se podijeliti u dvije odvojene skupine: LTB<sub>4</sub> i LTC<sub>4</sub>, koji se mogu transformirati u metabolite LTD<sub>4</sub> i LTE<sub>4</sub> (85). LT stvaraju različiti stanice kao što su: neutrofili, trombociti, vaskularne stanice, eozinofili, monociti, makrofazi, mastociti i bazofili.

**Prostaglandini** (PG) sintetiziraju se iz arahidonske kiseline, koja se otpušta sa staničnih fosfolipida enzimom citozolna fosfolipaza A<sub>2</sub> $\alpha$ , a potom oksigenira djelovanjem enzima ciklooksigenaze (86). Postoje dva enzima ciklooksigenaze (CO), (CO-1 i CO-2) (86). Varijanta CO-1 koja se nalazi u moždanoj kori nazvana je CO-3 (87). CO-1 odgovorna je za bazičnu razinu PG, dok je CO-2 odgovorna za produkciju PG nakon stimulacije, a ima značajnu ulogu u zarastanju kostiju (88). Ima šest prirodnih primarnih PG (PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>3</sub>, PGF<sub>1</sub> $\alpha$ , PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , PGF<sub>3</sub> $\alpha$ ) i još osam PG koji nastaju iz E-spojeva. PG su jaki medijatori upale aktivni i u malim koncentracijama (85). Uzrokuju vazodilataciju, agregaciju trombocita i kontrakciju glatke muskulature.

**Tromboksan** A<sub>2</sub> biološki jak je metabolit arahidonske kiseline i nastaje ciklooksigenaznim putem. Nestabilan je međuprodukt koji nastaje konverzijom PGG<sub>2</sub> u tromboksan B<sub>2</sub> u trombocitima (89). Tromboksani uzrokuju agregaciju trombocita, kontrakciju glatke muskulature, a mogu uzrokovati mitozu i apoptozu drugih stanica.

**Čimbenik aktivacije trombocita** (PAF, prema engl. „*Platelet-Activating Factor*“) proinflamatorni je medijator koji sintetiziraju i izlučuju mastociti, monociti i fiksni tkivni makrofagi. Nakon vezivanja PAF s receptorom na trombocitima, monocitima, makrofazima i neutrofilima dovodi do mnogih manifestacija anafilaksije (90). PAF uzrokuje agregaciju i degranulaciju trombocita i kontakciju plućnih glatkih mišića.

**Čimbenik kemotaksije eozinofila u anafilaksiji** (ECF-A, prema engl. „*Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis*“) značajan je medijator s ulogom u privlačenju eozinofila na mjesto upale. U mastocitima ECF-A preformiran je, dok u bazofilima se tvori nakon antigenske ili druge odgovarajuće stimulacije.

**Čimbenici kemotaksije neutrofila** selektivno privlače neutrofile na mjesto alergijske reakcije, te uzrokuju leukocitozu koja nastaje otpuštanjem neutrofila iz koštane srži (91).

**Proteaze koje stvaraju kinin** cijepaju i aktiviraju Hagemanov čimbenik da bi nastali kinini. Oni uzrokuju povećanu propusnost kapilara i kontakciju glatkih mišića, ali značajna je njihova uloga u pojavi boli, edema i oštećenja stanica u upalnoj bolesti zglobova (92).

U granulama mastocita i bazofila nalaze se i drugi medijatori kao što su: heparin, proteolitički enzimi, kisele hidrolaze i kolagenolitički čimbenici.

**Citokini** su velika obitelj više od stotinu malih proteina proizvedenih od različitih staničnih vrsta i koji kao ekstracelularni signalni proteini djeluju na ciljne stanice modulirajući različite stanične funkcije (93). Proizvode ih bijele krvne, ali i brojne druge stanice u tijelu (94). Podjela citokina prema stanicama koje ih proizvode (limfokini i monokini) nije zadovoljavajuća, s obzirom da brojne stanice proizvode citokine ovisno o čimbenicima stimulacije i interakcije s drugim stanicama. S toga se citokini opisuju kao: interleukini (IL), čimbenici nekroze tumora (TNF, prema engl. „*Tumor Necrosis Factors*“) i limfotoksini (LTs, prema engl. „*Lymphotoxins*“), interferoni (IFN, prema engl. „*Interferons*“, čimbenici stimulacije kolonija (CSF, prema engl. „*Colony-Stimulating Factors*“), kemokini i miješani citokini (95).

**Interleukini** dobili su ime po tome što ih luče leukociti i djeluju na leukocite, no danas se zna da ih luče i druge stanice te da djeluju i na fibroblaste, endotelne stanice, osteoblaste itd (1). Poznato je više od 18 IL, i većinu njih luče limfociti. Interleukini koje pretežno luče monociti i makrofagi imaju jako protuupalno djelovanje. IL-1 je jedan od značajnijih IL koji uzrokuje povišenje tjelesne temperature te nakupljanje i aktivaciju limfocita (raniji naziv je čimbenik aktivacije limfocita; LAF, engl. „*Lymphocyte-Activating Factor*“). Poznate su dvije različite molekule s navedenim djelovanjem, IL-1 $\alpha$  (koji je pretežno vezan za staničnu membranu) i IL-1 $\beta$  koji se izlučuje (95). IL-2 luče aktivirani pomagački T limfociti i

omogućuje dugotrajnu proliferaciju stimuliranih T limfocita (raniji naziv je TCGF, prema engl. „*T Cell Growth Factor*“), te je osobito važan u sazrijevanju T limfocita (96). IL-3 primarno stimulira hematopoezu, te pripada skupini citokina koji stimuliraju kolonije (CSF, prema engl. „*Colony Stimulating Factor*“), zbog čega se naziva i multi-CSF (1). Značajna uloga ostalih IL je u sazrijevanju aktiviranih B limfocita i proizvodnji protutijela (IL-4, IL-5, IL-6), diferencijaciji eozinofila (IL-5), sazrijevanju nezrelih limfocita T i B u primarnim organima (IL-7), kočenju djelovanja makrofaga i APC (IL-10), poticanju stanične imunosti i lučenju gama-interferona (IL-12) itd (1).

**Interferoni** značajni su citokini u kojih razlikujemo dva različita tipa: tip I, koji može biti  $\alpha$ -IFN (glavni stanični izvor leukociti),  $\beta$ -IFN (glavni izvor fibroblasti) te tip III ili imuni  $\gamma$ -IFN koji proizvode T limfociti (97), aktivirane NK stanice, a možda i makrofagi (1). IFN- $\alpha$  je aktivan protiv nekih specifičnih leukemija i limfoma, a ima ograničenu aktivnost protiv solidnih tumora (95). IFN- $\gamma$  ima glavnu ulogu u pokretanju i reguliranju imunog odgovora i jedan je od specifičnih citokina koji promovira Th1, a inhibira Th2 odgovor (95). Djeluje na aktivaciju makrofaga (raniji naziv MAF, prema engl. „*Macrophage Activating Factor*“), aktivaciju NK stanica, pojačava izražavanje antigena MHC I i II i antiproliferacijsko djelovanje (inhibicija umnažanja virusa i rasta nekih tumorskih stanica) (1).

**Čimbenici koji stimuliraju kolonije** (CSF, prema engl. „*Colony Stimulating Factors*“) obuhvaća: granulocitno-makrofagne (GM-CSF), granulocitne (G-CSF), monocitno-makrofagne (M-CSF) i multi-CSF koji je poznat i kao IL-3 (95). Ovi čimbenici potiču rast i diferencijaciju kolonija hematopetskih stanica *in vitro*. Multi-CSF djeluje na rast kolonija pluripotentnih stanica-matica, dok ostali djeluju na kolonije već diferenciranih stanica-matica (1).

**Kemokini** u osnovi su proinflamatorni citokini s kemotaktičnim svojstvima (95). Uključeni su u početak širenja upalne reakcije, koja je praćena sa sekvencijom neutrofila.



Poznato je više od 40 kemokina i identificirano je više od 20 različitih receptora za kemokine (98). Kemokini primarno su proteini male molekularne mase od 8-15 kD-a koji mogu biti podijeljeni u četiri strukturalne podfamilije, prema broju umetnutih aminokiselina između N-terminalnih cisteina: CC, CXC, CX2C, CX3C (95). Opisano je preko 12 različitih CXC kemokina i većina od njih privlači i aktivira neutrofile. Članovi subfamilije CC relativno su specifični za podraživanje makrofaga i T stanica, a neki članovi potentni su kemotaktični faktori za eozinofile i bazofile (95). Fractalin je jedini član CX3C subfamilije kemokina, ima molekularnu težinu od 38 kD-a i nalazi se kao glikoprotein vezan za membranu (99). Citokini uključeni u početak i reguliranje imunog odgovora, a koji se ne mogu klasificirati u navedene skupine nazivaju se „miješani citokini“ (95).

Većina receptora za citokine imaju dva lanca:  $\alpha$  koji je specifičan i veže samo taj citokin, i drugi lanac  $\beta$  koji je nespecifičan (isti je unutar obitelji), pa nakon vezivanja citokina i lanca  $\alpha$ , prenosi signal u stanicu (transdukcijska molekula) (1,95). U posljednje vrijeme citokini se svrstavaju u podskupine prema građi i djelovanju njihovih receptora.

## 1.6. GLAVNI KOMPLEKS TKIVNE PODUDARNOSTI

Sustav jakih antigena tkivne podudarnosti određen je genima koji se zovu glavni kompleks gena tkivne podudarnosti, skraćeno te gene, a time i njihove antigene, nazivamo glavni geni/antigeni tkivne podudarnosti (MHC, prema engl. „*Major Histocompatibility Complex*“) (1). U ljudi taj sustav nazivamo ljudski leukocitni antigeni, HLA (prema engl. „*Human Leukocyte Antigens*“), koji su kontrolirani genima koji se nalaze na kraćem kraku 6. kromosoma (100). Glavna uloga HLA antigena je u kontroli prepoznavanja vlastitog i stoga obrana protiv mikroorganizama (100). Na osnovu strukture i uloge HLA mogu se podijeliti u dvije klase: HLA I i HLA II. Postoje tri glavna tipa molekula klase I: HLA- A, -B i -C te tri glavne vrste molekula klase II: HLA-DP, -DQ i -DR (101). Klasa I antigena HLA izražena je

na većini stanica tijela koje imaju jezgru. Ovi antigeni nađeni su u solubilnoj formi u plazmi kao i adsorbirani na trombocite i eritrocite (100). Molekule HLA sastoje se od dva polipeptidna lanca:  $\alpha$ -lanac (oko 40 kD) određuju geni MHC, a  $\beta$ -lanac, koji se naziva  $\beta 2$ -mikroglobulin određuju geni na 15. kromosomu (102). Lanci su vezani nekovalentno, a  $\beta 2$ -mikroglobulin ima važnu ulogu kao strukturalna potpora  $\alpha$ -lancu (100). Najvažniji dio molekule jest onaj koji veže peptide, jer je glavna funkcija antigena MHC da vežu dijelove prerađenih tuđih antigena, čime tvore komplekse koje prepoznaju limfociti T. Dio koji veže peptide sastoji se od 180 aminokiselina stereokemijski podijeljenih u  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  dio, koji zajedno tvore pravilno složenu pukotinu u koju će se smjestiti prerađeni dio tuđeg antigena. Antigenska klasa II, koja obuhvaća HLA-DP, -DQ i -DR, nalazi se na imunokompetentnim stanicama, uključujući B-limfocite, makrofage, endotelijalne stanice i aktivirane T-limfocite (100), a mogu biti inducirani u većini stanica djelovanjem  $\text{INF-}\gamma$ . Ovi antigeni su također građeni od dva međusobno slična nekovalentno vezana lanca  $\alpha$  i  $\beta$ , oba lanca polimorfna su i relativne molekulske mase oko 30 kD-a (97). Antigeni klase II općenito pokreću imuni odgovor, što je razlog da se nalaze samo na imunokompetentnim stanicama (pretežno na APCs). Krajevi pukotine, na koju se veže strani prerađeni antigeni u klasi II su otvoreni, stoga se na nju mogu vezati veći peptidi od 10-30, u prosjeku 14 aminokiselina (97).

## **1.7. SURADNJA STANICA PRI IMUNOLOŠKOJ REAKCIJI**

U procesu reagiranja na strani antigen pojedine podvrste stanica imaju visoko specijaliziranu ulogu. Suradnja imunih stanica osnovni preduvjet je djelotvornog imunog odgovora. U imunom odgovoru strani antigen se procesuiru i prezentira na površini APC (100), u sklopu HLA molekule. Makrofazi nisu specifični za antigen, ali ga mogu prepoznati kao stranu tvar, fagocitirati, preraditi i prezentirati pomagačkim T limfocitima. Od pomagačkih T limfocita podraženi su samo oni limfociti koji su specifični za dani antigen .

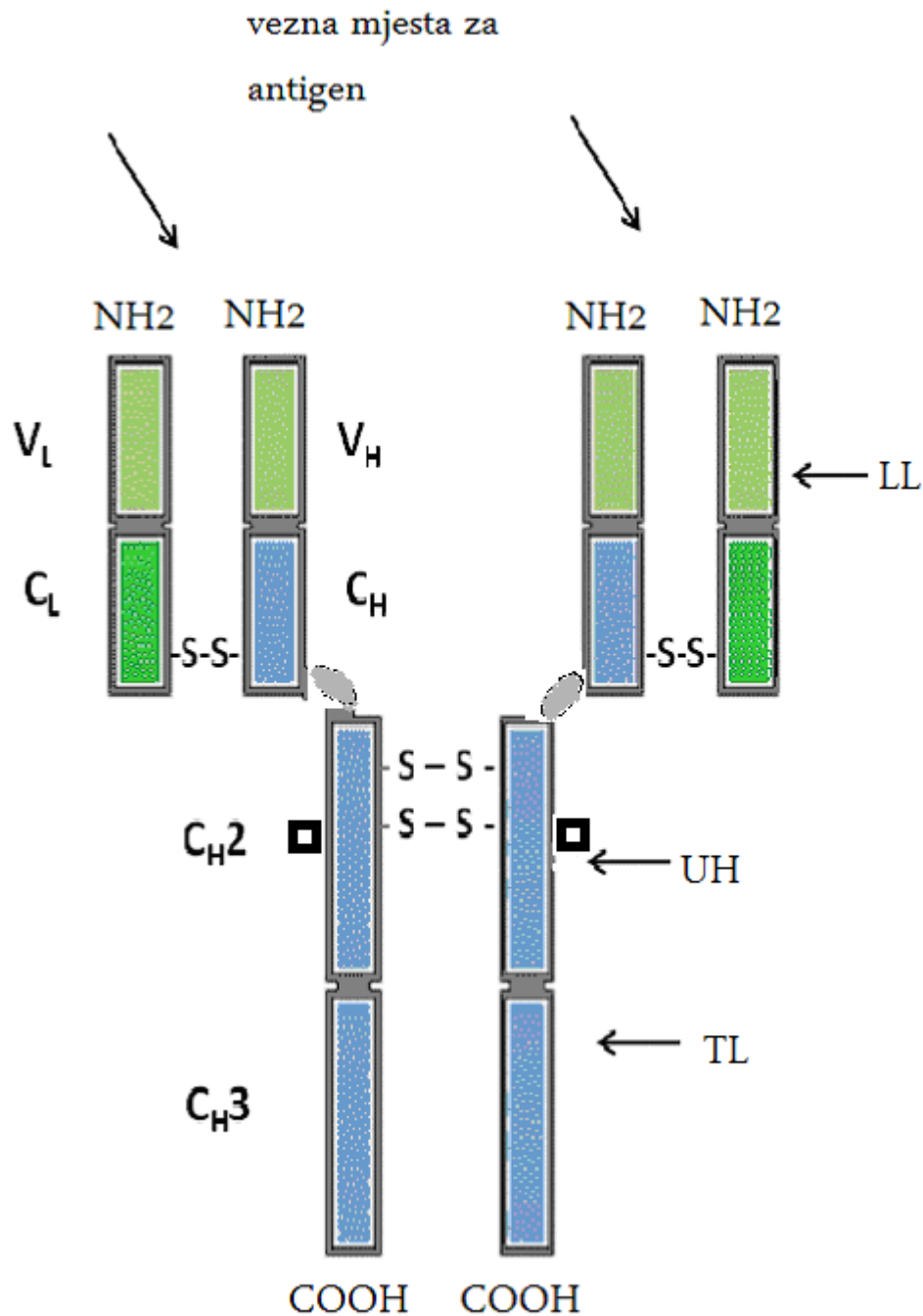
Dok je stanica CD8 predodređena da postane citotoksična, limfocit T koji nosi biljeg CD4 može se diferencirati u stanicu koja će poticati staničnu imunost (Th1) ili u stanicu koja će poticati humoralnu imunost (Th2) (25). Diferencijacija limfocita u Th1 i Th2 stanice potpuno je ovisna o produkciji citokina od strane APCs (makrofaga, dendritičnih stanica i B stanica). Th limfociti aktiviraju se kada njihov receptor (TCR) prepozna spoj antigenog peptida i molekula MHC na površini APCs. U nekim slučajevima, posebno u reakciji na neke viruse i tkivne presadke, za razvoj citotoksičnog limfocita T treba pomoć CD4+ limfocita (25). Tada obje podvrste limfocita T moraju istodobno i na istoj predočnoj stanici prepoznati tuđi antigen, CD4 u kontekstu antigena MHC-II, a CD8 u kontekstu antigena MHC-I (25). T citotoksični limfociti mogu ubiti ciljnu stanicu na najmanje tri različita načina, od kojih dva uključuju direktan kontakt s ciljnom stanicom, a treći način posredovan je citokinima, (npr. IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ ), koji luče se za cijelo vrijeme stimulacije TCR. Aktiviranje B limfocita obično zahtijeva pomoć T limfocita kao i makrofaga (103) Limfocit B može reagirati na tuđi antigena samo ako mu pri tome pomogne limfocit T (Th2) koji prepoznaje isti antigen, stoga se to naziva vezanim (engl. „*linked*“) prepoznavanjem (25). Patogen prvo mora podražiti APCs, ove stanice limfocite T koji se diferenciraju u Th2 stanice koji potiču limfocite B (25). Th limfociti prepoznaju na površini B limfocita antigene u sklopu MHC skupine II. Neki antigeni sposobni su efikasno aktivirati B limfocite i bez pomoći Th stanica. Za suradnju limfatičkih stanica nužno je da su limfociti uzeti iz adekvatno imuniziranih davalaca i da su T- i B-limfociti genetski identični. Genetski nesrodne stanice ne surađuju, što se označava kao genetska restrikcija suradnje limfocita (104)

## 1.8. IMUNOGLOBULINI

Glikoproteini koji imaju funkciju protutijela nazivaju se imunoglobulini (Ig). Imunost posredovana protutijelima nazivamo humoralnom imunošću. Plazma stanice koje nastaju

diferencijacijom limfocita B, sintetiziraju protutijela i izlučuju ih u izvanstaničnu tekućinu (1). Protutijela se pojavljuju u dva oblika; solubilna protutijela izlučena u krv i ostale tekućine i protutijela vezana za membranu B limfocita. Membranski Ig dio je B staničnog receptora koji veže strani antigen i pokreće aktivaciju B limfocita. Aktivirane B stanice diferenciraju se u plazma stanice koje proizvode solubilna protutijela ili u stanice pamćenja, koje obstaju godinama u tijelu i reagiraju na ponovni kontakt s istim antigenom (105). Svi Ig građeni su od temeljne jedinice (monomera) koja sastoji se od dva laka (L, prema engl. "Light") i dva teška (H, prema engl., "Heavy") lanca tako da je opća formula imunoglobulina (H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>)<sub>n</sub>. (106). Polipeptidi vezani su disulfidnim vezama koje vežu lake lance za teške lance kao i teške lance međusobno. Na osnovu razlike u primarnoj strukturi konstantne (C) regije teških lanaca ljudski imunoglobulini dijele se na pet klasa: IgG, IgA, IgM, IgD i IgE. Teški lanci nose oznake:  $\gamma$  za IgG,  $\alpha$  za IgA,  $\mu$  za IgM,  $\delta$  za IgD i  $\epsilon$  za IgE. U svih pet klasa imunoglobulina postoje samo dva tipa lakih lanaca: kapa ( $\kappa$ ) ili lambda ( $\lambda$ ) (107). U ljudi 65% Ig imaju  $\kappa$ - lance, a 35%  $\lambda$ -lance (104). Manje strukturne i antigenske razlike unutar klasa stvaraju subklase, tako da IgG ima četiri subklase ( $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  i  $\gamma_4$ ), IgA i IgM po dvije subklase ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  odnosno  $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ). Slijed aminokiselina u teškom lancu određuje klasu imunoglobulina. Daljnje varijacije u građi polipeptidnih lanaca određuju subklase, idiotipove i alotipove Ig-a (108). Polipeptidni lanci nisu ravni nego tvore globularne (kuglaste) strukture koje nazivamo domenama (106). Laki lanac sastoji se od dviju imunoglobulinskih domena koje se nazivaju varijabilna domena (V1) i konstantna domena (C1) Teški lanac svih razreda imunoglobulina sadrži po jednu varijabilnu domenu (VH) i 3 (IgG, IgA, IgD) odnosno 4 (IgM, IgE) konstantne domene (CH) koje se označavaju kao: CH1, CH2, CH3 i CH4 (106). Paratop vezno je mjesto za antigen i tvore ga aminokiseline varijabilne regije teškog i lakog lanca. Veličina veznog mjesta je da u njega stane oko 6 molekula glukoze (109) i to je površina u kojoj se nalazi žlijeb dužine dva nm, a širine i dubine oko jedan nm koji oblikuju 15-22

aminokiseline (106). Polimerni Ig imaju više monomera: IgM građen je od pet temeljnih jedinica (pentamer), IgA može biti monomer, dimer ili trimer (107). Polimerni oblici imaju spojni lanac J (prema engl. "Joining"), a sekretorni IgA, koji je obično dimer, ima i sekretnu komponentu (SC). Svi imunoglobulini sastoje se od aminokiselina i 3-18% oligosaharida koji nemaju utjecaja na specifičnost vezanja antigena (106). Zglobna regija dio je C-regije teškog lanca i osjetljiva je na djelovanje enzima. Enzim papain cijela molekulu Ig na tri dijela: dva Fab-fragmenta i Fc fragment. Fab fragmenti mogu vezati antigen jer sadrže paratop, a Fc fragment je nositelj bioloških svojstava molekule Ig (npr. vezanje komplementa, distribucija u organizmu, brzina kataboliziranja, sposobnost prolaska kroz placentu, sposobnost vezanja za makrofage, te pospješene fagocitoze) (107). Pepsin cijepa imunoglobulinsku molekulu na veliku molekulu /F(ab)<sub>2</sub>/ koja sadrži dva Fab-fragmenta i više manjih peptida. Antigenska stimulacija najvažniji je čimbenik koji utječe na sintezu imunoglobulina. Količina imunoglobulina u serumu povećava se tijekom postojanja konstantne stimulacije.



**Slika 1.** Shematski prikaz građe molekule imunoglobulina

NH<sub>2</sub>: N-terminalni dio lanca, COOH: karbhidratni dio lanca, V<sub>L</sub>: varijabilni dio lakog lanca

V<sub>H</sub>: varijabilni dio teškog lanca, C<sub>L</sub>: konstantni dio lakog lanca, C<sub>H</sub>: konstantni dio teškog lanca, S-S: disulfidne veze, LL: laki lanac, TL: teški lanac, UH: ugljikohidrati

### 1.8.1. Imunoglobulin G (IgG)

To je kvantitativno najvažniji serumski imunoglobulin, koji čini oko 80% intravaskularnih imunoglobulina i kao većina imunoglobulina ima dva identična vezna mjesta za antigen na jednoj molekuli imunoglobulina što omogućuje vezivanje antigena većom avidnošću, vezivanje ponavljanih epitopa ili vezivanje agregiranih antigena (110). Postoje četiri subklase IgG-a: IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4, a njihova distribucija na cirkulirajućim B limfocitima je: IgG2 (48%), IgG1 (40%), IgG3 (8%) i IgG4 (1%) (111). On je glavni imunoglobulin koji stvara se u sekundarnoj reakciji i najvažnija mu je funkcija neutraliziranje virusa, bakterijskih toksina, aktiviranje komplementa i poboljšanje fagocitoze opsonizacijom. IgG jedina je klasa Ig koja u čovjeka prolazi kroz placentu i odgovorna je za zaštitu novorođenčeta tijekom prvih mjeseci života. IgG2 mnogo sporije prolazi kroz placentu od ostalih podklasa (107). Poluživot u cirkulaciji IgG je 7-21 dan.

U većine životinja, a i u čovjeka otkrivena su homocitotropna protutijela klase IgG, a vjerovatno subklase IgG4, koja nazvana su IgG-S-TS (prema engl. „*IgG Short Time Sensitizing*“). Optimalno senzibiliziraju tkivo za 2-4 sata, senzibilizacija gubi se za 1-2 dana, i mogu biti uključeni u anafilaktički tip reakcije (112). U ljudi postoje tri vrste receptora za Fc fragment IgG. Humani Fc $\gamma$ RI (CD 64) može vezati monomerne IgG jakim afinitetom i izražava se na makrofagima i monocitima. Fc $\gamma$ RII (CD 32) receptor je slabog afiniteta i veže IgG u kompleksnom ili polimernom obliku i nalazi se na većini imunoloških stanica (113). Ljudski Fc $\gamma$ RIII (CD 16) receptor slabog je afiniteta i pojavljuje se na nekim velikim granuliranim limfocitima, K-stanicama, nekim NK-stanicama i neutrofilima (114). Pasivno vezivanje protutijela na ove Fc receptore odgovorno je za „naoružavanje“ (engl. „*arming*“) makrofaga, koji tada mogu citoksično djelovati. Fc $\gamma$ R-I mogu se naći i u solubilnom obliku gdje vezivanjem s IgG može utjecati na funkcije različitih stanica sprječavajući vezivanje IgG za membranski Fc $\gamma$ R (113).

### **1.8.2. Imunoglobulin A (IgA)**

On čini oko 13% serumskih imunoglobulina s poluživotom u cirkulaciji oko 5-6 dana. Kvantitativno glavni je Ig u ekstravaskularnim tekućinama, posebno u vanjskim sekretima (slini, suzama, probavnog, bronhalnog, vaginalnog, nazalnog sekreta i kolostruma). U ljudskom serumu nalazi se uglavnom kao monomer, dok u vanjskim sekretima javlja se uglavnom kao dimer sastavljen od dvije osnovne četveorolančane jedinice, lanca J (engl. „*joining*“) koji odgovoran je za polimerizaciju i sekretne komponente (SC) koja proizvod je lokalnih epitelnih stanica (106). J lanac je polipeptid molekularne mase 15 kD, bogat cisteinom i strukturalno potpuno različit od drugih imunoglobulinskih lanaca. Glavna uloga IgA u lokalnoj je zaštiti mukoznih površina tijela od virusa i bakterija. Spajanjem s mikroorganizmima on ih ne uništava, ali im sprječava prolaz kroz sluznice u organizam (106). U krvi IgA reagira s Fc receptorom FcαRI (ili CD 89) koji se nalazi na imunim efektorskim stanicama, te tako sudjeluje u upalnom odgovoru (115). Većina IgA sintetizira se i izlučuje iz lokalnih submukoznih plazmocita, a u manjoj mjeri dopire do sluznica transudacijom iz seruma. Postoje dvije različite strukture IgA (IgA1; 90% i IgA2; 10%) koje moguće da imaju i različite funkcije u imunom sustavu (116).

### **1.8.3. Imunoglobulin M (IgM)**

IgM čini oko 10% ukupnih imunoglobulina i obično je u obliku pentamera relativne molekulske mase 900.000 (19S) (107), te se naziva i makroglobulin. Građen je od pet osnovnih četveorolančanih jedinica povezanih u obliku zvijezde i lanca J. Djelotvoran je u izazivanje aglutinacije, a najuspješniji od svih imunoglobulina je u aktiviranju komplementa. Najvažnija uloga mu je u zaštiti intravaskularnog prostora od bakterija, a i mnoga „*prirodna*“ protutijela ovog su razreda (106). IgM, pored IgD, glavni tip je staničnog receptora na površini B limfocita. Poluživot mu je u cirkulaciji 5-6 dana. Ne prolazi kroz



placentu i prvi je Ig koji pojavljuje se u fetusu oko dvadesetog tjedna i koji javlja se u primarnoj reakciji na antigen.

#### **1.8.4. Imunoglobulin D (IgD)**

To je monomer s relativnom molekulskom masom oko 180 000 (7-8S) i normalno je prisutan u serumu u tragovima (0,2% ukupnih Ig u serumu) (107), a poluživot mu je oko 2,8 dana. Intravaskularno nalazi se 75% IgD. Molekula IgD ima visoko postavljenu zglobnu regiju te ga to čini vrlo osjetljivim na djelovanje proteolitičkih enzima. Molekula IgD ima tri konstantne domene i ne prolazi kroz placentu. Osnovna fiziološka uloga IgD nije poznata, često se, uz IgM, nalazi na površini B limfocita kao receptor za antigen. Kronične infekcije povećavaju serumsku koncentraciju IgD. IgD može imati ulogu u indukciji B stanica pamćenja, te ulogu u stvaranju tolerancije B stanica (116). Protutijela svih klasa i subklasa, osim IgD pokazuju sposobnost reguliranja vlastite proizvodnje mehanizmom povratne sprege (117).

#### **1.8.5. Imunoglobulin E (IgE)**

On čini oko 0,002% ukupnih serumskih imunoglobulina s poluživotom u serumu od 1-5 dana i Mr: oko 190.000 (8S) (166). Na površini mastocita poluživot mu iznosi više od deset dana (118). Molekule IgE javljaju se samo u obliku monomera. Imaju svojstvo homocitotropnosti tj. svojim fragmentom Fc (domene CH3 i CH4) vežu se za receptore FcεR na površini mastocita i bazofila (196), a prisustvo receptora za IgE visokog afiniteta na površini mastocita uzrok je njihove niske serumске koncentracije (118). Za razliku od ostalih imunoglobulina koji vežu se na Fc receptor samo kada je vezan antigen na protutijelo IgE veže se na FcεR I i u odsustvu antigena (118). Vezivanje antigena na vezani IgE, izaziva degranulaciju mastocita i oslobađanje farmakoloških medijatora anafilaksije (106). Fiziološka uloga IgE nije poznata. Serumске koncentracije IgE povišene su u atopijskim bolestima i parazitarним infekcijama. IgE može inducirati staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima

protiv parazita. Vezujući se za parazite ciljano privlači eozinofile koji vežu se na IgE i izlučuju svoje toksične produkte koji mogu ubiti, oštetiti ili odstraniti parazita (118).

U industrijskim državama alergijske reakcije glavni su uzrok povišene koncentracije IgE u serumu dok u agrarnim i državama u razvoju glavni uzrok su parazitarne infekcije. Povišene serumske vrijednosti IgE mogu se otkriti u osoba i prije klinički izražene alergije. Za određivanje ukupnog serumskog IgE koristi se radioimunosorbentni test (RIST). Za određivanje specifičnog alergena na koji osoba je preosjetljiva koristi se radioalergosorbentni test (RAST) ili kožni testovi. RAST-om (i varijantama) mjerimo prisustvo specifičnih IgE protutijela na pojedine alergene. Kožnim testovima ubodom ili intradermalnim testovima mogu se otkriti IgE protutijela vezana na površini mastocita i bazofila. Proizvodnju IgE u čovjeka reguliraju T limfociti (81).

## **1.9. KOMPLEMENT**

Sastoji se od tridesetak membranskih i serumskih proteina koji se nalaze u inaktivnom obliku (119). Zajedno čine oko 15% globulinske frakcije plazme. To je glavni humoralni posrednik u reakcijama antigena i protutijela. Komponente komplementa sintetiziraju se u jetri, ali i u epitelnim stanicama tankog crijeva, žučnog mjehura, makrofazima i monocitima. Oni učestvuju kao faktori urođene imunosti u upalnoj reakciji, ali djeluju i kao pojačivači stečenog imunog odgovora (120). Jedna od glavnih uloga komplementa je liza ciljane stanice (bakterija ili virusa), uloga u osponizaciji, pokretanju imunoregulatornih i staničnih funkcija i odstranjivanju imunokompleksa. Osnovno događanje prilikom aktivacije komplementa je kovalentno vezanje C3b na strani (ili vlastiti) antigen (121). U ljudi postoje dva receptora za komplement (CD21 i CD35), koji su određeni odvojenim, ali vezanim genima. Nalaze se na svim eritrocitima, B stanicama, nekim hematopoetskim i stromalnim stanicama. Komplement može biti aktiviran klasičnim, alternativnim i lektinskim putem. U sva tri puta centralnu

ulogu ima aktiviranje komponente C3 (120). Klasični put aktiviraju protutijela nakon humoralnog odgovora, prirodna protutijela, kompleksi antigena i protutijela i agregirani imunoglobulini. U čovjeka reakciju započinju Ig klase IgM te podklasa IgG1, IgG2 i IgG3. Među podklasama IgG najjači aktivator komplementa je IgG3. Aktivacija klasičnim putem najčešće počinje međusobnim prepoznavanjem i reagiranjem komponente C1 i molekule protutijela (119). Protutijelo stječe sposobnost prepoznavanja C1 tek nakon što se vezalo s antigenom. Time se mijenja prostorna konfiguracija protutijela pa sa na fragmentu Fc (domena CH2 na IgG, odnosno CH3 na IgM) otkriva vezno mjesto za C1 (119). Neimunološku aktivaciju komplementa klasičnim putem mogu izazvati: tripsinu slični enzimi, DNA, stafilokokni protein A i C-reaktivni protein.

Alternativni put u manjoj mjeri stalno je aktivan, ali do jake aktivacije dolazi samo na mjestima gdje je proces amplifikacije zaštićen od regulatornih mehanizama (104). Ovaj put aktivacije ne ovisi o imunološkoj reakciji i može se smatrati jednim od mehanizama nespecifične imunološke obrane. Alternativni put aktivacije komplementa osniva se na neprekidnom spontanom raspadanju C3 na C3a i C3b. Nastali fragmenti C3b mogu se vezati za membrane stanica koje se nalaze u blizini, no s obzirom da membrane stanica sadrže dosta sijalinske kiseline koja brzo inaktivira vezani C3b, stoga spontano raspadanje nema gotovo nikakav učinak na stanice vlastitog organizma (119). Na površini bakterija, virusa i gljivica ima malo sijalinske kiseline te C3b ostaje duže aktivan i uz ostale tvari (faktor B i D) može doći do aktivacije komplementa alternativnim putem. Lektinski put aktivacije komplementa nastaje prepoznavanjem i vezanjem lektinskih proteina na molekulu udruženu s patogenom (PAMPs, prema engl. „*Pathogen-Associated Molecular Patterns*“) (120). Do sada su identificirana tri puta aktivacije lektinom (122). I alternativnom i klasičnom putu aktivacije komplementa zajedničko je stvaranje kompleksa C5b6789, koji se ugrađuje u membranu i predstavlja mjesto litičkog oštećenja stanice (119). Aktivacijom komplementa nastaju i anafilatoksini (fragmenti

C3a i C5a), kininima slične substancije (c-kinini) i hematoksini (C3a, C5a, C5b, C6, C7) (119). Anafilatoksini i c-kinini dovode do kontrakcije glatke muskulature i vazodilatacije, a hematoksini pomažu lizu leukocita. Nekoliko serumskih proteina ograničava i modulira djelovanje komplementa. C1-inhibitor (C1 INH) inhibira enzimsku aktivnost C1 i njegovih podjedinica C1r i C1s, uglavnom stvaranjem ireverzibilnih kompleksa (123). Ostali načini reguliranja sustava komplementa obuhvaćaju sprječavanje nastanka C3-konvertaze, raspadanje već stvorene C3-konvertaze, sprječavanje nastanka kompleksa koji napada membranu, inaktivaciju anafilatoksina i dr (119).

## **1.10. TIPOVI ALERGIJSKIH REAKCIJA**

Prema Coombs-u i Gell-u postoje četiri tipa alergijskih reakcija: rana preosjetljivost (tip I), citotoksične reakcije (tip II), reakcije preosjetljivosti uzrokovane imunokompleksima (tip III) i kasna preosjetljivost (tip IV) (124). Prva tri tipa alergijskih reakcija uzrokovana su protutijelima, dok je IV tip uzrokovan staničnom imunošću.

### **1.10.1. Rane reakcije preosjetljivosti (tip I)**

Ove reakcije posredovane su s IgE, a mastociti i bazofili primarne su stanične komponente ovog tipa imunološke reakcije. IgE ima receptor jakog afiniteta na mastocitima i bazofilima na koji vežu se molekule IgE. Rana alergijska reakcija nastaje kada se alergen veže za dvije molekule IgE na površini mastocita ili bazofila. Interakcijom alergena i IgE protutijela oslobađaju se medijatori koji djeluju na mnoge ciljne organe. Za razliku od primarnih medijatora koji su preformirani u granulama (histamin, serotonin i eozinofilni kemotaktički faktor-A), sekundarni medijatori (čimbenik agregiranja trombocita, leukotrieni, kinini i prostaglandini) stvaraju se nakon premošćenja antigenom dviju molekula IgE (125). Većina medijatora uzrokuje kontrakciju glatkih mišića, povećanje mukozne sekrecije, vazodilataciju krvnih žila, privlačenje eozinofila i neutrofila te agregaciju trombocita. Nakupljanjem

eozinofila, njihovom reakcijom s IgE i degranulacijom oslobađaju se tvari koje pridonose upalnoj reakciji i nanose dodatno oštećenje okolnom tkivu (125). Anafilaktički šok nastaje izraženom vazodilatacijom u koži, sluznicama i unutarnjim organima te spazmom bronhijalne i gastrointestinalne muskulature koja dovodi do akutne respiratorne obstrukcije i abdominalnih kolika (126). Kožni simptomi najčešće su urtikarija i pruritus. Rane reakcije, u prethodno senzibiliziranih osoba, razvijaju se vrlo brzo najčešće unutar par minuta ili sati što ovisi i o putu unošenja alergena (127). Aktivacija B limfocita koji će, prešavši u plazma stanice, sintetizirati i lučiti protutijela IgE pod nadzorom je limfocita T (81). Od čestih bolesti koje se razvijaju po prvom tipu reakcija perosjetljivosti su urtikarija i urtikarijelne reakcije na lijekove.

### **1.10.2. Citotoksične reakcije preosjetljivosti (tip II)**

Ove reakcije uključuju vezivanje protutijela i komplementa na stanicu te rupturu stanice. Antigeni u ovom tipu reakcije su endogeni, iako i egzogeni antigeni (hapteni) mogu dovesti do ovog tipa reakcije. Vezivanjem protutijela i antigena na površini stanice olakšava se fagocitoza obzirom da fagociti imaju receptor za Fc fragment protutijela, što nazivamo opsonizacija (125). Najčešća protutijela koja su uključena u ovaj tip reakcije su IgM ili IgG klase koja dobro aktiviraju komplement. Aktiviranjem sustava komplementa stvara se C3b koji također opsonizacijom olakšava fagocitozu, te izravna liza stanice koja nastaje aktiviranjem finalnog kompleksa (C5b-9) (125). Stanice obavijene protutijelima mogu biti lizirane K-stanicama (celularna citotoksičnost ovisna o protutijelima, ADCC), T limfocitima i fagocitima, naročito makrofagima i eozinofilima (104). Zajedničko je svojstvo tih stanica da imaju: receptor za Fc fragment Ig, citotoksični potencijal i metabolički su aktivne. Najčešće kliničke manifestacije ovog tipa preosjetljivosti su lijekovima uzrokovane agranulocitoze, trombocitopenije, hemolitičke anemije (128), te transfuzijske reakcije zbog nepodudarnosti ABO sustava i/ili drugih eritrocitnih antigena (125). Spajanjem protutijela s antigenom na

površini stanice može ponekada dovesti do stimulacije stanične funkcije. Ta pojava označava se kao stimulacijska preosjetljivost (reakcije tipa V). Primjer takvog učinka je djelovanje LATS (prema engl. „*long acting thyroid stimulator*“) protutijela koja se vežu za receptore TSH štitnjače i nekontrolirano ih podražuju (125). ADCC neki nazivaju hipersenzitivnom reakcijom tipa VI.

### **1.10.3. Reakcije preosjetljivosti uzrokovane imunokompleksima (tip III)**

Spajanjem protutijela i antigena u tjelesnim tekućinama nastaju imunokompleksi (ICs, prema engl. „*Immune Complexes*“). Stvaranje imunokompleksa fiziološka je pojava i predstavlja efikasan mehanizam za odstranjivanje antigena iz organizma (129). Omjer antigena i protutijela određuje veličinu imunokompleksa. ICs formirani u velikom suvišku antigena mali su, ne vežu komplement, općenito ne mogu pokrenuti upalni proces (130), a i brzo se izlučuju kroz membrane za filtriranje. ICs formirani u suvišku protutijela, sposobni su aktivatori komplementa, veliki su i netopljivi, vrlo brzo se fagocitiraju te im je ograničena patogenost (130). Oštećenje tkiva uzrokovano je uglavnom ICs srednje veličine (Mr: oko  $10^6$ ). Oni dobro aktiviraju komplement i fagocite, a slabo prolaze kroz membrane za filtriranje. Najčešće su uključena protutijela klase IgM i IgG. Sporo odstranjivanje ICs fagocitima, dovodi do deponiranja ICs u kožu, mikrocirkulaciju bubrega, zglobova i gastrointestinalnog trakta. ICs djeluju putem aktivacije komplementa i odgovorni su za edem, krvarenje, infiltraciju neutrofilima i otpuštanje proinflammatoryh medijatora kao što su TNF i IL-1 (203). Ovaj tip imunološke reakcije počinje obično nekoliko sati do nekoliko dana od ulaska alergena. IgG Fc receptori (FcγRs, posebno FcγR III) i komplement (osobito anafilatoksin C5a) glavni su efektori u akutnom upalnom odgovoru uzrokovanom ICs (132). Različite stanice, kao što su makrofazi, neutrofil i trombociti dolaze na mjesto depozita ICs i doprinose daljnjem oštećenju tkiva (127). Za oštećenje tkiva od velike važnosti je i

propadanje aktiviranih granulocita i oslobađanje lizosomskih enzima koji mogu oštetiti stijenku krvnih žila i glomerula.

#### **1.10.4. Kasna (stanična) preosjetljivost (tip IV)**

Ova reakcija posredovana je T limfocitima. Za razliku od prethodna tri tipa preosjetljivosti, u ovom tipu preosjetljivosti protutijela nisu uključena, iako mogu biti prisutna u serumu bolesnika (127). Postoje tri podtipa kasne preosjetljivosti: kontaktna preosjetljivost, preosjetljivost tuberkulinskog tipa i granulomatozna preosjetljivost. Kontaktni alergijski dermatitis (KAD) je upalna reakcija kože koja prati perkutanu absorpciju antigena s površine kože i nakupljanje prethodno senzibiliziranih antigen-specifičnih T limfocita u koži (133). Većina antigena male su molekulske težine manje od 500 Daltona (134). Reakcija ima dvije faze, fazu senzibilizacije i fazu imunog odgovora. Faza senzibilizacije događa se u limfnim čvorovima (125). Kada antigen dođe u kontakt s kožom on biva procesuiran i prezentiran u sklopu HLA-DR na površini Langerhansovih stanica (134), koje djeluju kao antigen prezentirajuće stanice u koži. Stanice CD4<sup>+</sup> Th prepoznaju prezentirani antigen u sklopu MHC klase II, dok antigeni prezentirani u sklopu MHC klase I prepoznaju se CD8<sup>+</sup> citotoksičnim T limfocitima (135). Kompleks HLA-DR i antigena u interakciji s T limfocitima dovodi do specifične klonalne proliferacije T stanica koje cirkuliraju kroz tijelo i vraćaju se nazad u kožu (134). Nakon ponovnog dodira s istim antigenom Langerhansove stanice predočuju ga memorijskim T limfocitima i aktiviraju ih. Dio aktiviranih T stanica oslobađa brojne brojne topljive čimbenike koji djeluju kao medijatori kasne preosjetljivosti, a drugi dio populacije postaje citotoksičan (136). Obzirom na raznolikost produkcije citokina od strane T limfocita kasna preosjetljivost može se podijeliti u podtipove: podtip pri kojemu citokini i kemokini primarno uzrokuju nakupljanje i aktivaciju monocita (IVa), eozinofila (IVb) ili neutrofila (IVd), dok je podtip IVc posredovan direktno s T limfocitima bilo CD4<sup>+</sup> ili CD8<sup>+</sup> koje učestvuju i u svim oblicima IV tipa reakcija preosjetljivosti (135,137). Kada T

limfociti prepoznaju strani antigen vezan na staničnu membranu uništavaju stanicu direktno otpuštanjem enzima perforina i granzyma B, i tada ih nazivamo Tc limfociti. Reakcija kasne preosjetljivosti najjače je izražena nakon 48-72 sata, a nakon toga slabi, čemu pridonose PGE što ih luče makrofazi i keratinociti te IL-10 (125).

Tuberkulinski tip kasne preosjetljivosti pojavljuje se pri subkutanoj primjeni solubilnih antigena mikroorganizama kao što su mikobakterije. Ubrizgavanjem tuberkulina u kožu osoba senzibiliziranih mikobakterijama tuberkuloze, razviti će se na mjestu uboda crvenilo i otvrdnuće koje doseže vrhunac između 24 i 72 sata (125), s dominantnom infiltracijom makrofaga. Za granulomatoznu kasnu reakciju značajno je prisustvo antigena u makrofazima, kao i u samoj leziji. Granulomi su organizirane kolekcije zrelih makrofaga koji ispoljavaju tipičnu morfologiju i nastaju kao odgovor na intracelularno prisustvo antigena ili stranog tijela (138). Granulomi koji sadrže limfocite, ekstracelularni matriks, kalcifikacije i kazeoznu nekrozu nazivamo kompleksnim granulomima (138). Vrijeme nastajanja granulomatozne reakcije je od 21-28 dana.

## **1.11. ATOPIJA I ATOPIJSKE BOLESTI**

Termin atopija (engl. „*atopy*“) prvi su upotrijebili, 1923. g. Coca i Cooke pri opisu rane reakcije preosjetljivosti koje imaju tendenciju nasljeđivanja (81). Nasljeđivanje atopijskih bolesti kompleksno je i ne uklapa se u Mendeljejeva pravila nasljeđivanja (139). „Atopijski marš“ (AM, prema engl. „*Atopic March*“) označava prirodni tijek alergijskih ili atopijskih manifestacija, karakterističnom pojavom kliničkih simptoma i stanja koja se pojavljuju u određenoj dobi i traju više godina (140). Povećanje incidencije alergijskih bolesti zadnjih godina je zbog disbalansa Th1/Th2 limfocita, većom pojavom Th2, i sekrecijom citokina IL-4, IL-5, IL-10 i IL-14 (140). Sekrecija ovih citokina stimulira sintezu IgE, diferencijaciju i sazrijevanje eozinofila i mastocita (139). Smatra se da disbalans Th1/Th2, prema Th2 u



alergičnih osoba posljedica je zapadnjačkog načina života (140) i smanjenom izloženosti bakterijama u ranom djetinjstvu, (tzv. „higijenska teorija“). Rani znakovi atopije su: povišene vrijednosti IgE, pozitivan kožni „prick“ test na jaja ili grinje kućne prašine u prvoj godini života i prisustvo specifičnog IgE na uobičajenu hranu i/ili inhalacione alergene tijekom ranog djetinjstva (141). U prevenciji atopijskih bolesti preporuča se dojenje (140), davanje čvrste hrane nakon 6 mjeseci starosti i izostavljanje jaja u prehrani u djece koja pokazuju znake atopijskog ekcema (142).

### **1.11.1. Atopijski dermatitis**

To je kronična recidivirajuća upalna bolest kože s karakterističnom distribucijom ekcemskih kožnih promjena, suhom kožom, jakim svrbežom i širokim spektrom patofizioloških zbivanja (143). Termin atopijski dermatitis prvi su upotrijebili Sulzberger i sur. 1930.g. pri opisu poremećaja koji se pojavljuje tijekom ranog ili adolescentnog doba (144). Danas se preporuča rabiti termin atopie ekcema dermatitis sindrom (AEDES) (145)

Hanifin i Rajka 1980.g. (146) preporučili su kriterije za dijagnozu atopijskog dermatitisa, koji se dijele na „glavne“ i „sporedne“. „Glavni“ kriteriji su: svrbež, osobit oblik i raspored promjena na koži i atopija u obiteljskoj ili osobnoj anamnezi. Neki od „sporednih“ kriterija (ukupno 22) su: suhoća kože, povišen IgE, rana pojava dermatitisa, sklonost kožnim infekcijama, oštećena celularna imunost, pityriasis alba itd. Kriteriji za dijagnozu atopijskog dermatitisa pretežno uključuju: recidivirajući osip praćen svrbežom, ranu pojavu dermatitisa, svrbež kože, zahvaćenost pregiba i atopiju u obiteljskoj anamnezi. Prevalenca AD je 10-20% u djece, a 1-3% u odraslih i povećava se zadnjih decenija (145). Prevalenca AD u ruralnim regijama manja je u odnosu na urbana područja što sugerira povezanost s „higijenskom hipotezom“, prema kojoj odsustvo izloženosti infektivnim agensima tijekom ranog djetinjstva povećava osjetljivost prema alergijskim bolestima (146). Bazični defekt u AD-u je promijenjeni sastav lipida kornealnog sloja, što dovodi do suhoće kože i povećane

propusnosti za alergene i iritanse, te pojačanog gubitka vodenog sadržaja kože (TEWL, engl. "*Transepidermal Water Loss*"). Kliničkom slikom AD dominiraju edem, eritem i papulozni osip ili suhoća kože i lihenifikacija, ovisno starosti lezije (akutna ili kronična).

U ranoj dječjoj dobi prve ekcematozne lezije obično zahvaćaju obraze i vlasište, a svrbež počinje par tjedana kasnije. U adolescentnoj dobi promjene zahvaćaju pregibe, zatiljak dorzalne strane ekstremiteta, a u odrasloj dobi lihenificirani plakovi su na pregibima, glavi i vratu. Histološkim pregledom akutnih lezije nađe se upalni infiltrat sastavljen pretežno od CD4+ memorijskih T limfocita, a kronične lezije pokazuju i povećan broj mastocita, eozinofila i Langerhansovih stanica s IgE na površini (147).

Patogeneza AD nije poznata, ali izgleda da je bolest posljedica genetske sklonosti, imune disfunkcije i poremećaja epidermalne barijere (148) i nastaje interakcijom gena i čimbenika okoliša. Većina dosadašnjih studija fokusirana je bila na gene koji su uključeni u stečeni i urođeni imuni odgovor, no sada je interes za gene koji su uključeni u disfunkciju kožne barijere. Bolest obuhvaća dvije velike skupine gena: geni koji kodiraju epidermalne ili epitelijalne strukturne proteine i geni koji kodiraju dijelove imunog sustava (59).

Nekoliko mogućih lokusa udruženih s AD-om nalaze se na kromozomima: 3q21(149), 1q21, 16q, 17q25, 20p (150), i 3q26 (151). Najveća povezanost nađena je na kromozomu 1q21, na kojem se nalazi obitelj gena vezana za epidermis koji se nazivaju „*epidermalni diferencijacijski kompleks*“ (152), posebno na FILAGRIN (prema engl. "*Filament-Aggregating Protein*", FLG), protein matriksa kože koji omogućava agregaciju keratina (153). Nekoliko gena koji kodiraju dijelove imunog sustava identificirano je na kromozomu 5q31-33 (59). Svi oni kodiraju citokine uključene u reguliranju sinteze IgE: IL-4, IL-12, IL-13 i čimbenik stimulacije kolonija granulocita-makrofaga (GM-CSF, engl. „*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*“) (59). AD kompleksan je genetski poremećaj, stoga bolest se javlja u predisponiranih osoba djelovanjem specifičnih čimbenika okoliša

(151). Kao i za mnoge bolesti s kompleksnim nasljeđem smatra se da za povećanje incidencije uzrok mora tražiti u čimbenicima okoliša, obzirom da genetski „pool“ se nije mnogo promijenio u relativno ograničenom vremenskom periodu (151). Različiti faktori okoliša pokazali su se bitnim u fenotipskoj ekspresiji genetski determinirane sklonosti prema AD-u, a to su: aeroalergeni, kontaktne supstancije, hrana, mikroorganizmi, dlaka životinja, seksualni hormoni, stres, klima itd. Mikroorganizmi, poglavito *Staphylococcus aureus*, mogu se naći u preko 90% kožnih lezija AD-a (154). Njihovi sastavni dijelovi mogu djelovati kao strani antigeni, a egzotoksini kao superantigeni pogoršavajući AD. Mogu se razlikovati dvije forme AD-a: AD udružen s IgE (atopijski, ranije zvan „ekstrinzični“ AD) i AD koji nije udružen s IgE (neatopijski, ranije zvan „intrinzični“ AD) (155). Novija saznanja impliciraju da prirodni tijek AD ima tri faze. Inicijalna faza je neatopijska forma dermatitisa u ranoj dječjoj dobi, kada se senzibilizacija nije još pojavila (59). U 60-80% bolesnika genetski faktori utječu na pojavu senzibilizacije posredovane IgE na hranu i/ili faktore okoliša; to je prijelazna faza prema pravom AD-u. Treće, grebanjem oštećene stanice kože otpuštaju autoantigene koji uzrokuju pojavu IgE autoprotutijela u određenog broja bolesnika s AD-om (59). Autoantigeni koje srećemo u atopiji su *Hom s 1-5* i DSF 70, (prema engl. „*Dense Fine-Speckles*“ 70), otkriveni su u ciljnim organima u atopiji i u efektorskim stanicama (bazofili, mastociti i T stanice) (156). Molekularna analiza otkrila je veliku sličnost alergena okoliša i humanih proteina (156) što je dovelo do zaključka da autoimunost prema dijelovima denaturiranih proteinskih epitopa križano reagira s egzogenim alergenima (157).

Alergijski rinitis, astma i atopijski dermatitis atopijske su bolesti s istom patogenetskom osnovom i 30-60% djece s AD-om će oboljeti od respiratornih bolesti kao što su bronhalna astma, polenska groznica ili alergijski rinitis u kasnijoj dobi (tzv. „atopijski marš“) (140). „Čisti“ AD je bez respiratornih simptoma, a „miješani“ označava AD s respiratornim simptomima.

### **1.11.2. Alergijski rinitis i astma**

Rinitis je upalna reakcija nazalnog epitela praćena s kihanjem, nazalnom kongestijom, svrbežom i curenjem nosa, ali oči, uši, sinusi i grlo također mogu biti zahvaćeni. U senzibiliziranih osoba specifični IgE veže se na mastocite i bazofile, a inhalirani alergen vezanjem s IgE na mastocitima i bazofilima dovodi do otpuštanja brojnih medijatora (158). Nakon 4-8 sati ovi medijatori dovode do aktivacije i nakupljanja drugih upalnih stanica u sluznici kao što su: neutrofilni, eozinofili, limfociti i makrofazi (159) koje su privučene i stimulirane nizom citokina i upalnih medijatora (IL-5, leukotrieni, GM-CSF) (160). U kasnijoj fazi manje je izraženo kihanje i svrbež, a više nazalna kongestija i mukozna sekrecija. Mnogi bolesnici s alergijskim rinitisom imaju hiperreaktivnost donjih dišnih puteva ili bronhalnu preosjetljivost, što pokazuje povezanost gornjih i donjih dišnih puteva u reakcijama preosjetljivosti. Bronhalna hiperreaktivnost (BHR) je stanje karakterizirano pretjeranim bronhospazmom u kontaktu s provokacijskim stimulansima. Astma je u dječjoj dobi češća u dječaka, što je vjerovatno vezano za fiziološki užu dišne puteve, povećan mišićni tonus i mogući viši IgE (161). Ta se razlika gubi nakon desete godine života, pa je u odrasloj dobi astma češća u žena (161,162). U astmatskoj reakciji sudjeluju oba specifična tipa imunološkog odgovora, humoralni i stanični. Upalne promjene u dišnim putevima osoba s astmom dovode do bronhoobstrukcije, što je povezano sa dominantnim simptomima astme kao što su: kašalj, otežano disanje, stridor i pritisak u prsima.

### **1.11.3. *Dermatophagoides pteronyssinus***

Grinje kućne prašine su jedan od glavnih izvora alergena u kućanstvu. Široko su rasprostranjene, a najčešće su *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Dp*) (europska prašinska grinja) i *Dermatophagoides farinae* (*Df*) (američka prašinska grinja). Nalazimo ih u starom namještaju, tepisima, zavjesama, madracima i dr. Životni ciklus, od jajašca do odrasle jedinice traje oko 19-30 dana, što ovisi o okolišu (vlaga, temperatura) (163). Pri vlažnosti zraka ispod

60% prestaju rasti i ugibaju. Hrane se ljuskama kože ljudi. Većina alergena prašinskih grinja nalazi se u formi fekalnih masa u kućnoj prašini kao zrakom nošene čestice. Njihova srednja veličina je oko 20  $\mu\text{m}$  (164). Analizom ekstrakta grinja kućne prašine nađeno je preko 30 različitih proteina koji mogu inducirati specifična protutijela klase IgE u bolesnika alergičnih na prašinske grinje (165). Većina glavnih alergena prašinskih grinja porijeklom su iz digestivnog trakta. Skupina I alergena, *Dp1* i *Df1*, imaju tri opća i dva epitopa specifična za vrstu (166). To su termolabilni glikoproteini Mr: oko 25 kD-a, proteolitički su enzimi i odgovaraju cistein proteazama (166). Skupina II alergena odgovara lizozimu, skupina III je analogna tripsinu, a skupina IV su amilaze. Sve skupine alergena prašinskih grinja mogu uzrokovati stvaranje specifičnih IgE u ljudi.

#### **1.11.4. Dijagnostika alergijskih bolesti**

Dijagnostika alergijskih bolesti počinje s kliničkom anamnezom i fizikalnim pregledom. Pronalazak alergena koji pogoršava ili uzrokuje alergijsku bolest neophodan je za njegovo smanjenje ili eliminaciju iz okoliša. Alergijske reakcije najčešće posredovane su s IgE-om, ali mogu biti uključena i protutijela klase IgG i IgA. Za otkrivanje uzročnog alergena koristimo testove koji mogu biti: kožni test (*in vivo*) i testovi kojima se određuju specifični serumski IgE (*in vitro*).

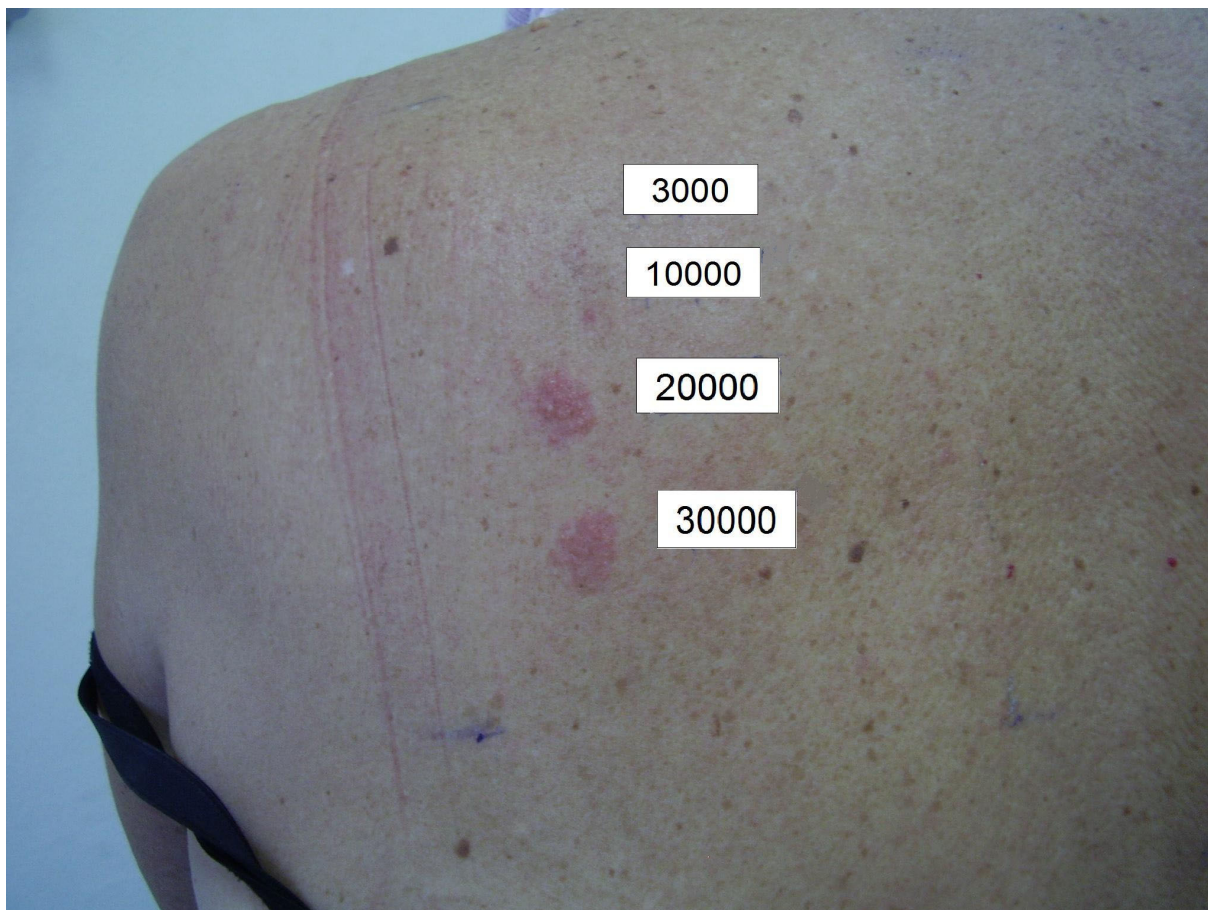
Od testova „*in vitro*“ najčešće se koristi radioimunotest, (RIA, prema engl. „*Radioimmunoassay*“), koji spada među najosjetljivije imunološke testove i zasniva se na kompeticiji radioaktivnim izotopom obilježenog i neobilježenog antigena za vezna mjesta na protutijelima. Postoje dvije inačice radioimunotesta: radioimunosorbentni test (RIST) i radioalergosorbentni test (RAST). RIST-om se određuje ukupni serumski IgE, a RAST-om određujemo specifični IgE za pojedini antigen, a sekundarno IgE protutijelo je  $^{125}\text{J}$ -anti IgE. Specifični IgE može se određivati i ELISA testom (prema engl. „*Enzyme Linked Sorbent Test*“) gdje je sekundarno IgE protutijelo obilježeno s enzimom (167). U varijanti RAST-a

(„CAP System“) alergeni su vezani za hidrofилни polimer nosač uklopljen u kapsulu („Immuno CAP“). Prema nekim studijama CAP ima istu dijagnostičku vrijednost kao i kožni testovi (168). RAST-om se mogu određivati i protutijela IgG4 (blokirajuća protutijela), koja su čini se glavna komponenta u imunološkom odgovoru na specifičnu imunoterapiju (161). Za dijagnozu alergijskih bolesti „in vivo“ koristimo kožne testove. Za testiranje ranih oblika preosjetljivosti koristimo: kožni test ubodom (engl. „skin prick test“, SPT), „prick-prick“ test, intradermalni i test grebanjem (engl. „scratch test“). Test ubodom koristi se za utvrđivanje preosjetljivosti na inhalacione alergene, alergene radne sredine i na hranu. Test se izvodi najčešće na volarnoj strani podlakice standardiziranim alergenskim pripravcima poznate biološke aktivnosti (169). Istodobno testira se i otopinom histamin-hidroklorida u koncentraciji 1mg/mL, (pozitivna kontrola) i puferskom otopinom (negativna kontrola). Rezultati se očitavaju nakon 15-20 minuta, a promjer urtike  $\geq 3$ mm smatra se pozitivnim rezultatom (170), uz uvjet pozitivne reakcije na otopinu histamina i negativne na pufersku otopinu. „Prick-prick“ test koristi svježju hranu kao alergen. Lancetom prvo se ubode u svježju hranu, a potom u kožu. Očitavanje i evaluacija testa isti su kao i u „prick“ testu (167). Pri intradermalnom testu alergen se unosi u kožu, a pri testu grebanjem („scratch“ test) kontakt s alergenima omogućen je oštećenjem površnog kožnog sloja.

Za dijagnozu kontaktne preosjetljivosti, pored anamneze i kliničke slike, važna je i funkcionalna ekspozicijska pretraga tzv. epikutano testiranje. Alergeni, u odgovarajućim koncentracijama apliciraju se na kožu leđa, a rezultati se očitavaju nakon 48h i 72h prema stupnju lokalne upalne reakcije. Dodatno očitavanje može se ponoviti za 6-7 dana, što povećava broj pozitivnih rezultata za oko 10% (171). Za rutinsko testiranje koristi se standardna serija kontaktnih alergena. Profesionalna kontaktna serija alergena karakteristična je za svaku profesiju. Foto „patch“ testom otkrivaju se fotoalergeni. Otvoreno epikutano testiranje provodi se pri postojanju velike mogućnosti iritacije ili senzibilizacije na alergen,

kao i pri ispitivanju kontaktne urtikarije i kontaktnog dermatitisa na proteine. Test očitavamo prvih 30-60 minuta (rano očitavanje) i nakon 3-4 dana (kasno očitavanje).

**Atopijski „patch“ test (APT)** postupak je koji uključuje epikutano testiranje s alergenima za koje se zna da uzrokuju reakcije posredovane s IgE-om i procjenu dobivenih rezultata. Test se koristi za identifikaciju stanicama posredovane imunosti na hranu i aeroalergene u djece s atopijskim dermatitisom (170). T stanični odgovor je značajan u lezijama atopijskog dermatitisa ali i u reakciji u APT-u (171). Ekspresija IgE-receptora na epidermalnim Langerhansovim stanicama (172) može objasniti IgE posredovanu aktivaciju T-stanica specifičnih za antigen, koje izazivaju ekcemske kožne lezije u APT-u. Alergen specifične T-stanice izolirane s mjesta APT-a i one u početku luče Th2 spektar citokina, dok nakon 48h dominira lučenje Th1 spektra citokina (173). Epikutani test na prašinske grinje može izazvati ekcemsku reakciju u pacijenata s AD-om (174) što upućuje na povezanost mehanizma nastanka lezija AD-a i onih nastalih epikutanim testiranjem. Oba mehanizma predstavljaju kasni tip kontaktne preosjetljivosti. Dobiveni su pozitivni rezultati i na niske koncentracije aeroalergena, što pokazuje sposobnost istih da i u malim koncentracijama prodiru u kožu i uzrokuju ekcemsku reakciju.



**Slika 2.** Pozitivan atopijski „patch“ test na koncentracije *Dp* 1 od 20000 i 30000 BJ/ml

Provokacijski testovi nisu rutinski dijagnostički postupci i mogu biti specifični i nespecifični. Specifični testovi izazivaju reakciju samo u senzibiliziranih osoba. Provokacijskim testovima izaziva se i objektivizira reakcija na alergen u određenom organu ili tkivu senzibilizirane osobe. Mogu biti nazalni, konjunktivalni i bronhalni (175). Pri alergiji na hranu može se koristiti ekspozicija potencijalnom alergenu ili eliminacijska dijeta s isključenjem potencijalnog alergena u trajanju od 1-4 tjedna.



### **1.11.5. Liječenje atopijskog dermatitisa**

Cilj tretmana u AD-u je popravljjanje kožnih promjena kao što su: suhoća kože, svrbež, prisustvo superinfekcije i upalne reakcije. Obzirom da je u pitanju kronična narav bolesti, potrebno je upoznati bolesnika s neophodnom njegom kože tijekom cijelog života.

#### **Opće mjere**

Svakodnevna uporaba emolijensa zajedno s hidracijom kože predstavljaju glavno uporište u općem liječenju AD-a (176). Preporučaju se dnevne kupke s mlakom vodom i blagim sredstvima za čišćenje kiselog Ph, bez iritansa i senzibilizirajućih supstancija. Ovi bolesnici ne podnose toplinu zbog poremećaja u znojenju što povećava svrbež (177). Optimalan okoliš za ove bolesnike je temperatura od 18°C i relativna vlažnost od oko 50%. Preporuča se rabiti odjeću i posteljinu od pamuka ili drugih mekih vlakana.

#### **Antihistaminici**

Uporaba sedirajućih i nesedirajućih antihistaminika u liječenju svrbeži pokazala se nedjelotvornom u poređenju s placebom (177). Korist od sedirajućih antihistaminika mogu imati pacijenti koji imaju alergijski rinitis, dermografizam, koprivnjaču ili poremećaj spavanja (178). Nema dokaza da dodatak blokatora H<sub>2</sub> antihistaminika ima koristi (179). Od nove generacije antihistaminika loratadin, terfenadin, akrivastin i cetirizin su se pokazali najdjelotvornijim u liječenju simptoma AD-a (180).

#### **Kortikosteroidi**

Sistemske kortikosteroidi nisu prvi izbor terapije u AD-u, ali mogu se primijeniti kada je ostala terapija nedjelotvorna (180). Lokalno aplicirani steroidi predstavljaju, nekoliko decenija, glavno uporište u terapiji AD-a i drugih upalnih poremećaja (180). Samo kortikosteroidi male jačine mogu se primijeniti na lice, prepone i pazuhe da bi se smanjili lokalno neželjeni efekti kao što su: akne, strije, teleangiektazije i atrofija (178). Steroidi male jačine

primjenjuju se u djece obzirom da ona imaju relativno veću površinu kože u odnosu na masu tijela, što povećava mogućnost sistemske absorpcije lijeka (178).

### **Interferoni**

Zbog inbalansa između Th1 i Th2 limfocita, prema Th2 u AD-u dolazi do smanjene produkcije  $\gamma$ -interferona. Pokazano je da terapija s  $\gamma$ -interferonom u dozi od  $5\mu\text{g}/\text{m}^2$  dnevno tijekom tri mjeseca pokazuje dobre rezultate s minimalnim sporednim efektima (179).

### **Antagonisti leukotriena**

Leukotrieni su inflamatorni modulatori nastali iz arahidonske kiseline lipooksigenaznim putem (181). Antagonisti leukotrienskih receptora (montelukast i zafirlukast) uspješno su primijenjeni u astmi, a istražuje se njihova primjena u AD-u.

### **Lokalni kalcineurin inhibitori**

Calcineurin inhibitori, pimekrolimus i takrolimus imunosupresivni su lijekovi primarno primijenjeni u sprječavanju odbacivanja alogeničnog transplantata (181). Selektivni su inhibitori aktivacije T stanica inhibiranjem kalcineurin fosfataze (99). Najčešći nepoželjni efekti su iritacija i pečenje kože, a potrebna je zaštita od sunca (179). Pri primjeni navedene terapije pozornost je usmjerena na mogući povećani rizik od pojave maligniteta (180). Pimekrolimus i takrolimus indicirani su za kratkotrajnu terapiju ili povremeni duži tretman u bolesnika starijih od dvije godine koji ne reagiraju ili ne podnose drugu konvencionalnu terapiju (181). Prisustvo *Staphylococcus aureus*-a na bolesnoj i zdravoj koži bolesnika s AD-om potpuno opravdava primjenu antibiotskih lijekova, koji također su djelotvorni pri pogoršanju bolesti (182).

### **Ostala terapija**

Ultravioletna (UV) fototerapija koristeći UVB, UVA ili psoralen plus UVA (PUVA) može biti korisna u težim oblicima bolesti. Ostale terapijske mogućnosti su primjena ciklosporina A, azatioprina, IgE blokirajućih protutijela i kompleksa alergena i protutijela (182).

## Hiposenzibilizacija

Imunoterapija (hiposenzibilizacija) uključuje primjenu subkutanih injekcija s rastućim koncentracijama specifičnog alergena u bolesnika s alergijom. Alergen specifična imunoterapija (SIT) jedina je imunomodulatorna i etiološka terapija alergije i astme (183). Imunoterapija se osobito uspješno provodi u oboljelih od rinokonjunktivitisa i astme koji su preosjetljivi na polen, grinje ili životinjski epitel (184). SIT s *Dermatophagoides pteronyssinus*-om znatno smanjuje učestalost astmatičnih napada i poboljšava pulmonalnu funkciju u djece s alergijskom astmom (183). Ona reducira razinu IL-4 i IL-13 i regulira imbalans Th1/Th2 stanica u djece s astmom (183). Citokini IL-4 i IL-13 bitni su u pojavi astmatične reakcije. Preliminarni rezultati sugeriraju da SIT za alergijski rinitis može smanjiti rizik od kasnije pojave astme u djece (184), obzirom da postojanje alergijskog rinitisa predstavlja rizik za pojavu astme u kasnijoj dobi. Rani tretman sa SIT u djece koja su preosjetljiva samo na grinje kućne prašine smanjuje pojavu preosjetljivosti na druge alergene (184). Isti pripravak za hiposenzibilizaciju ne smije sadržavati više od 2 do 4 alergena i zajedno se ne kombiniraju sezonski i trajni alergeni (185). Neki alergeni (kućne prašine, otrovi insekata ili gljivica) imaju jaku proteolitičku aktivnost te se ne smiju miješati s drugim alergenima (175). SIT treba početi provoditi isto ranije i to standardiziranim pripravcima (186) u trajanju od oko 3 do 5 godina. Pored uspješnosti u terapiji alergijskog rinitisa i astme SIT može se koristiti i u liječenju AD-a, iako su rezultati o uspješnosti različiti (186). Werfel i sur. pokazali su da alergen-SIT u trajanju od jedne godine s alergenima grinja kućne prašine poboljšava ekcem u bolesnika sa AD-om koji su senzibilizirani na grinje kućne prašine (187). Sublingvalna imunoterapija sa standardiziranim ekstraktom grinja djelotvorna je u djece sa srednje teškim alergijskim dermatitisom, dok su rezultati znatno slabiji u teškim oblicima bolesti (188).

## 2.0. HIPOTEZA I CILJEVI RADA

Prolaskom kroz kožu alergen *Dp 1* u osoba preosjetljivih na ovaj alergen, prezentiran je od strane Langerhasnovih stanica, subpopulaciji Th2 limfocita koji promoviraju stvaranje sIgE i humoralnu imunost (otkriva se SPT-om). Nakon 48 sati, lučenjem IL-12 od strane eozinofila, makrofaga i dendritičnih stanica, dolazi do prekapčanja i stimuliranja subpopulacije Th1 limfocita koji promoviraju staničnu imunost koja je i osnova za APT.

SIT negativizira APT jer djeluje na parametre koji su uključeni u staničnu imunološku reakciju (popravlja poremećen balans T regulatornih i T efektorskih limfocita, smanjuje sintezu sIgE i potiče stvaranje blokirajućih IgG protutijela). Koncentracija sIgE ovisi o antigenskoj stimulaciji, koja je u fazi remisije AD-a snižena.

AD lokaliziran je u koži, ali eozinofili i Th2 limfociti cirkuliraju tijelom, uzrokuju sistemske reakcije i mogu dovesti do senzibilizacije respiratornog sustava. Upalna alergijska reakcija u koži predisponira bolesnike za pojavu težih oblika astme.

Na osnovu prethodnih činjenica formiraju se hipoteze:

1. Aplikacija *Dp1* alergena u trajanju od 48 sati (APT) u preosjetljivih osoba na koži će izazvati ekcemsku reakciju. U svih ispitanika s pozitivnim kožnim „prick“ testom (SPT) će biti pozitivan i atopijski „patch“ test (APT) na alergen *Dp 1*. APT se može koristiti u procjeni uspješnosti specifične imunoterapije (SIT).
2. Specifični IgE (sIgE) prema *Dp 1* snižen je u fazi remisije AD-a.
3. APT je češći u bolesnika s respiratornim simptomima u kojih je AD prethodio pojavi respiratorne alergije.

### CILJEVI RADA:

1. Utvrditi značenje *Dp 1* u nastanki i pogoršanju AD-a.
2. Istražiti odnos humoralne (SPT) i stanične imunost (APT).

3. Utvrditi optimalnu koncentraciju za testiranje *Dp* 1 u APT-u izraženu u Biološkim jedinicama/ml
4. Ispitati mogućnost primjene APT-a u procjeni uspješnosti SIT-e.
5. Pratiti dinamiku sIgE tijekom remisije i egzacerbacije AD-a.
6. Procijeniti odnos AD-a i pridružene respiratorne alergije na *Dp* 1.
7. Istražiti smislenost primjene APT u svakodnevnoj kliničkoj obradi bolesnika s AD-om.

### **3.0. ISPITANICI I METODE RADA**

#### **3.1. ISPITANICI**

U ispitivanje je uključen 61 bolesnik s atopijskim dermatitisom (AD-om), dijagnosticiranim prema kriterijima Hanifin-a i Rajka (146), 24 osobe muškog i 37 osoba ženskog spola, starosti 18-65 godina (prosječno: 43,33g; SD:15,025). Ispitivani su bolesnici u fazi remisije AD-a, koji zadnjih mjesec dana nisu primali lijekove što utječu na imunoreaktivnost organizma. RAST u fazi egzacerbacije AD-a određivan je prije početka terapije. Isključeni su bili ispitanici s bolestima i stanjima koja su mogla utjecati na rezultate testiranja.

Naknadno su formirane dvije skupine bolesnika:

1. bolesnici koji su primali SIT s *Dp*-om kao alergenom (sve 4 koncentracije alergena spravljenih u Imunološkom zavodu u Zagrebu u trajanju od najmanje tri godine),
2. bolesnici koji nisu primali SIT s *Dp*-om kao alergenom.

Kontrolnu skupinu činilo je 30 zdravih osoba; 13 muških i 17 osoba ženskog spola, starosti 18-65 godina (prosječno: 48,63 g, SD:11,294).

#### **3.2. METODE RADA**

##### **3.2.1. Atopijski „patch“ test**

Kvadratić filter papira (1x1cm) natopili smo alergenskim pripravkom *Dp*-a, pokrili celofanom i leukoplastom fiksirali na kožu leđa. Testove s alergenima skidali smo nakon 48 sati, a rezultate smo očitavali nakon 48 i 72 sata.

Kao kontrola služio nam je filter papir natopljen s puferskom otopinom bez alergena. Rezultate smo očitavali prema stupnju lokalne upalne reakcije, prema terminologiji preporučenoj od strane European Task Force of Atopic Dermatitis (ETFAD) (189,190):

—	negativna reakcija
?	samo eritem, sumljiva
+	eritem, infiltracija
++	eritem, nekoliko papula, edem i po koja vezikula
+++	eritem, mnogo papula, jača infiltracija, vlaženje, reakcije izvan mjesta testiranja
++++	eritem, mnogobrojne papule i vezikule, jako vlaženje, erodirana površina

Za APT koristili smo pripravke *Dp 1*, pripravljene u Imunološkom zavodu u Zagrebu, u navedenim koncentracijama:

1. 3 000 Bioloških jedinica /ml (BJ/ml) u puferskoj otopini
2. 10 000 BJ/ml u glicerolu
3. 20 000 " "
4. 30 000 " "
5. Otapalo - negativna kontrola

APT smo radili u Alergološkoj ambulanti OB Karlovac.

### 3.2.2. Test ubodom

Kap alergena aplicirali smo na očišćenu volarnu stranu podlaktice. Kroz kap uboli smo kožu lancetom s vrhom dužine 1 mm. Nakon uboda tupferom je odstranjen višak alergena. Reakciju smo očitavali nakon 10-15 minuta. Pojava urtike promjera 3 i više mm smatrali smo pozitivnim testom. Kao pozitivna kontrola služila je otopina histamina u koncentraciji od 1 mg/ml (5,43 mmol/L). Za negativnu kontrolu služilo je otapalo za alergenski pripravak. Alergenski pripravak za testiranje bio je *Dp1* u koncentraciji od 1600 BJ/ml u puferskoj fiziološkoj otopini i 50% glicerolu, spravljen u Imunološkom zavodu u Zagrebu. Navedeni test urađen je u Alergološkoj ambulanti OB Karlovac.

UKUPNI SERUMSKI IgE: Iz venepunkcijom dobivene krvi izdvojili smo serum. Ukupni serumski IgE određen je Imx testom za ukupni IgE („Enzyme Immunoassay“- MEIA), Abbot Laboratories-USA na aparatu tipa Axsym. Vrijednosti ukupnog IgE do 120 IU/ml smatrane su normalnim.

IgE protiv *Dermatophagoides pteronyssinus*-a (RAST): Navedeni test rađen je, iz krvi uzete venepunkcijom, sistemom CAP-RAST (Pharmacia, Uppsala, Sweden ). Vrijednosti  $\geq 0,70$  kU/L smatrale su se pozitivnim.

Za sve ispitanike s AD-om i članove kontrolne skupine ispunjen je upitnik s osnovnim podacima, anamnezom, dermatološkim statusom te laboratorijskim rezultatima i rezultatima testiranja (Prilog 1).

## Prilog 1

ANKETNI LIST ZA BOLESNIKE S ATOPIJSKIM  
DERMATITISOM

IME

PREZIME: \_\_\_\_\_ r. \_\_\_\_\_

ADRESA: \_\_\_\_\_ tel \_\_\_\_\_

ZANIMANJE: \_\_\_\_\_

GLAVNE TEGOBE: \_\_\_\_\_

VRIJEME POJAVE PRVIH TEGOBA/DERMATITISA: \_\_\_\_\_

TRAJANJE DERMATITISA:

1. Traje cijelu godinu
2. Češće u pojedinim mjesecima (kojim?) \_\_\_\_\_
3. Javlja se u nepravilnim razmacima tijekom cijele godine
  - a) 1-5 puta godišnje
  - b) češće od 5 puta godišnje

ČIMBENICI KOJI IZAZIVAJU/POGORŠAVAJU

DERMATITIS: \_\_\_\_\_

UTJECAJ KUĆNE PRAŠINE: \_\_\_\_\_

UTJECAJ \_\_\_\_\_ POJEDINE

HRANE: \_\_\_\_\_ UTJECAJ ŽIVOTNE I

RADNE SREDINE: \_\_\_\_\_

OSTALE PREOSJETLJIVOSTI: \_\_\_\_\_

OSTALE BOLESTI: \_\_\_\_\_

ATOPIJSKE BOLESTI U OBITELJI: \_\_\_\_\_

DOSADAŠNJE LIJEČENJE: \_\_\_\_\_

DERMATOLOŠKI STATUS: \_\_\_\_\_

---

LABORATORIJSKI NALAZI:

UKUPNI SERUMSKI IgE: \_\_\_\_\_

SERUMSKI IgE PREMA *Dp*-u:

1. Egzacerbacija AD-a: \_\_\_\_\_
2. Remisija AD-a: \_\_\_\_\_

REZULTATI TESTIRANJA NA *Dp*:

1. Atopijski "patch" test (APT):

- a) 3.000 BJ/ml u puferskoj fiziološkoj otopini: \_\_\_\_\_
- b) 10.000 BJ/ml u glicerolu: \_\_\_\_\_
- c) 20.000 BJ/ml u glicerolu: \_\_\_\_\_
- d) 30.000 BJ/ml u glicerolu: \_\_\_\_\_  
otapalo: \_\_\_\_\_



2.TEST UBODOM:

- a) 1600 BJ/ml u puferskoj f.o.+50%  
glicerol: \_\_\_\_\_
- b) Histamin: \_\_\_\_\_
- c) Otapalo: \_\_\_\_\_

AD: Atopijski dermatitis

*Dp: Dermatophagoides pteronyssinus*

BJ/ml: Biološka jedinica/ml

f.o.: fiziološka otopina

### 3.3. STATISTIČKA OBRADA

Rezultati su prikazani tabelarno. Prikazane su distribucije ispitanika po pojedinim varijablama i skupinama, također su prikazane procjene parametara za varijable u uzorku prema skupinama ispitanika. Kvalitativne varijable testirane su na  $\chi^2$  testom, odnosno po potrebi Fisher Exact testom, te za ponovljena mjerenja Stuart-Maxwell testom. Kvantitativni podaci testirani su Kolmogorov-Smirnovim testom unutar grupno na normalne distribucije. Za podatke koji su pokazali odklon od normalne distribucije razlike između skupina testirane su neparametrijskom statističkom metodom (Mann-Whitney testom) (191,192).

#### 4.0. REZULTATI

U ispitivanje bio je uključen 61 ispitanik s AD-om i 30 članova kontrolne skupine, slične dobi i spola (Tablica 1).

**Tablica 1**

Ispitanici s atopijskim dermatitisom i članovi kontrolne skupine prema dobi i spolu

DOB (GOD.)							
Skupina	SPOL	N	Medijan	Prosjeak	S.D.	Minimum	Maximum
Kontrola	M	13	51,00	50,15	11,647	25	65
	Ž	17	47,00	47,47	11,231	25	61
	Ukupno	30	50,50	48,63	11,294	25	65
Atopijski dermatitis	M	24	49,00	46,88	14,332	25	65
	Ž	37	45,00	41,03	15,205	18	65
	Ukupno	61	45,00	43,33	15,025	18	65
Ukupno	M	37	50,00	48,03	13,378	25	65
	Ž	54	45,00	43,06	14,291	18	65
	Ukupno	91	48,00	45,08	14,067	18	65

M: muškog spola

Ž: ženskog spola

S.D.: standardna devijacija

U 68,9% ispitanika (42/61) s AD-om ukupni serumski IgE bio je povišen, a u kontrolnoj skupini nađen je povišen ukupni IgE u 13,3% ispitanika (4/30). Postojala je statistički značajna razlika u ukupnoj serumskoj koncentraciji IgE u ispitanika s AD-om i članova kontrolne skupine ( $Z:4,399$ ,  $p < 0,001$ ) (Tablica 2), kao i u distribuciji ukupnog serumskog IgE u ispitanika s AD-om i članova kontrolne skupine ( $\chi^2: 24,80$ ;  $df=1$ ;  $p < 0,001$ ) (Tablica 3).

### Tablica 2

Testiranje razlika u ukupnoj serumskoj koncentraciji IgE u ispitanika a s atopijskim dermatitisom i članova kontrolne skupine

	Skupina	N	Prosjek ranga	Mann-Whitney Test
Σ IgE	Kontrola	30	28,63	Z = 4,399 P < 0,001
	Atopijski dermatitis	61	54,54	
	Ukupno	91		

N: broj ispitanika

Σ IgE: ukupne serumske koncentracije IgE

**Tablica 3**

Distribucija ukupne serumske koncentracije IgE u ispitanika s atopijskim dermatitisom i članova kontrolne skupine

$\chi^2 = 24,80; df= 1; P < 0,001$			$\Sigma$ IgE		Ukupno
			normalan	patološki	
Skupina	Kontrola	N	26	4	30
		%	86,7	13,3	100,0
	Atopijski dermatitis	N	19	42	61
		%	31,1	68,9	100,0
Ukupno		N	45	46	91
		%	49,5	50,5	100,0

N: broj ispitanika

$\Sigma$  IgE: ukupne serumske koncentracije IgE

Nije nađena statistički značajna razlika u ukupnoj serumskoj koncentraciji IgE u ispitanika s „čistim“ AD-om u odnosu na ispitanike s AD i respiratornim simptomima („miješani“ AD) ( $p=0,115$ ) (Tablica 4).

#### Tablica 4

Ukupne serumske koncentracije IgE u ispitanika s atopijskim dermatitisom i ispitanika s atopijskim dermatitisom i respiratornim simptomima

Fisher's Exact Test $P = 0,115$ $p > 0,005$		$\Sigma$ IgE		Ukupno
		normalan	patološki	
AD	N	17	29	46
	%	37,0	63,0	100,0
AD+RS	N	2	13	15
	%	13,3	86,7	100,0
Ukupno	N	19	42	61
	%	31,1	68,9	100,0

N: broj ispitanika

$\Sigma$  IgE: ukupne serumske koncentracije IgE

AD: atopijski dermatitis

RS: respiratorni simptomi

Specifični IgE (sIgE) određen RAST-om u fazi remisije AD-a u odnosu na kontrolnu skupinu prikazan je u Tablici 5 (pozitivnih 14/61; 23,0%), a sIgE u fazi egzacerbacije AD-a, u odnosu na kontrolnu skupinu, u Tablici 6 (pozitivnih 16/61; 26,2%). Nađena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u koncentraciji sIgE u ispitanika s AD-om u fazi remisije AD-a u odnosu prema članovima kontrolne skupine (Tablica 5;  $P = 0,004$ ), kao i u koncentraciji sIgE u ispitanika s AD-om u fazi egzacerbacije u odnosu na članove kontrolne skupine ( $p = 0,001$ ) (Tablica 6).

**Tablica 5**

Specifični IgE prema *Dp1* u fazi remisije atopijskog dermatitisa u odnosu na članove kontrolne skupine

Fisher's Exact Test $P = 0,004$ $p < 0,005$			RAST		Ukupno
			-	+	
Skupina	Kontrola	N	30	0	30
		%	100,0	0	100,0
	Atopijski dermatitis	N	47	14	61
		%	77,0	23,0	100,0
Ukupno		N	77	14	91
		%	84,6	15,4	100,0

N: broj ispitanika

RAST -/+: specifični IgE  $< / \geq 0,70$  kU/L

**Tablica 6**

Specifični IgE prema *Dp1* u fazi egzacerbacije atopijskog dermatitisa u odnosu na članove kontrolne skupine

Fisher's Exact Test P = 0,001 p<0,005			RAST		Ukupno
			-	+	
Skupina	Kontrola	N	30	0	30
		%	100,0	0	100,0
	Atopijski dermatitis	N	45	16	61
		%	73,8	26,2	100,0
Ukupno		N	75	16	91
		%	82,4	17,6	100,0

N: broj ispitanika

RAST -/+: specifični IgE </≥ 0,70 kU/L



U ispitanika s AD-om, u fazi remisije, nađen je sIgE povišen u 14 ispitanika (22,9%), a u istih ispitanika, u fazi egzacerbacije, bio je povišen u 16 ispitanika (26,2%), što ne predstavlja statistički značajnu razliku ( $Q= 2,00$ ;  $df= 1$ ;  $p=0,157$ ) (Tablica 7). Povišen sIgE nije nađen u članova kontrolne skupine.

### Tablica 7

Specifični IgE u ispitanika s atopijskim dermatitsom u fazi egzacerbacije i remisije bolesti

Stuart-Maxwell test $Q=2,00$ ; $df= 1$ ; $P = 0,157$ $p>0,005$		Egzacerbacija AD-a		Ukupno
		RAST		
		-	+	
Remisija AD-a  RAST	-	45	2	47
	+	0	14	14
Ukupno		45	16	61

RAST -/+: specifični IgE  $< / \geq 0,70$  kU/L

AD: atopijski dermatitis

Rezultati kožnog testa ubodom (SPT) u ispitanika s AD-om i članova kontrolne skupine prikazani su u Tablici 8. U 18/61 ispitanika s AD-om (29,5%) navedeni test bio je pozitivan. Nađena je statistički značajna razlika u rezultatima SPT u ispitanika s AD-om i članova kontrolne skupine ( $p < 0,001$ ), u kojih nije bilo pozitivnih testova.

**Tablica 8**

Rezultati kožnog testa ubodom u ispitanika s atopijskim dermatitisom i članova kontrolne skupine

Fisher's Exact Test $P < 0,001$			SPT		Ukupno
			-	+	
Skupina	Kontrola	N	30	0	30
		%	100,0	0	100,0
	Atopijski dermatitis	N	43	18	61
		%	70,5	29,5	100,0
Ukupno		N	73	18	91
		%	80,2	19,8	100,0

SPT -/+ : kožni test ubodom, urtika  $< / \geq 3$  mm

U 11/61 ispitanika s AD-om (18%) APT bio je pozitivan, dok u kontrolnoj skupini pozitivnih testova nije bilo(0/30), što predstavlja statistički značajnu razliku ( $p < 0,001$ ) (Tablica 9).

### Tablica 9

Rezultati atopijskog „patch“ testa u ispitanika s atopijskim dermatitisom i članova kontrolne skupine

Fisher's Exact Test P = 0,014 P<0,001			APT		Ukupno
			-	+	
Skupina	Kontrola	N	30	0	30
		%	100	0	100
	Atopijski dermatitis	N	50	11	61
		%	82	18	100
Ukupno		N	80	11	91
		%	87,9	12,1	100

N: broj ispitanika

APT -/+ : atopijski „patch“ test negativan/pozitivan

Od ukupnog broja ispitanika s AD-om 15 ispitanika (24,59%) imalo je i respiratorne simptome („miješani“ AD). Pozitivan APT u ispitanika s „miješanim“ AD-om (AD+RS) bio je češće pozitivan (8/15, odnosno 53,33%) u odnosu na ispitanike s „čistim“ AD-om (3/46, odnosno 6,51%) ( $p < 0,001$ ) (Tablica 10).

### Tablica 10

Rezultati APT u ispitanika s atopijskim dermatitsom i ispitanika s atopijskim dermatitisom i respiratornim simptomima

Fisher's Exact Test		$p < 0,001$		
Skupina		AD (N)	AD+RS (N)	Ukupno (N)
APT	+	3 (6,51%)	8 (53,33%)	11
	-	43 (93,49%)	7 (46,67%)	50
Ukupno		46 (100,0%)	15 (100,0%)	61 (100%)

N: broj ispitanika

AD: atopijski dermatitis

RS: respiratorni simptomi

APT -/+ : atopijski „patch“ test negativan/pozitivan

Statistički značajna razlika postojala je u pozitivitetu APT-a u ispitanika s AD-om koji su primali SIT (9/16 odnosno 56,3% pozitivnih testova) i onih koji nisu primali SIT (2/45 odnosno 4,4% pozitivna testa) (Tablica 11). APT češće je bio pozitivan u ispitanika s AD-om koji su primali SIT ( $p < 0,001$ ).

U ispitanika s AD i RS („miješani“ atopijski dermatitis) kožne promjene su se pojavile prije 2. g. života u 87% ispitanika (13/15).

**Tablica 11**

Rezultati APT u ispitanika s AD koji su primali i onih koji nisu primali specifičnu imunoterapiju

Fisher's Exact Test P < 0,001			APT		Ukupno
			-	+	
SIT	-	N	43	2	45
		%	95,6%	4,4%	100,0%
	+	N	7	9	16
		%	43,8%	56,3%	100,0%
Ukupno		N	50	11	61
		%	82,0%	18,0%	100,0%

N: broj ispitanika

APT -/+ : atopijski „patch“ test negativan/pozitivan

SIT -/+ : Specifična imunoterapija nije/je davana

Na Tablici 12 prikazan je međudnos SPT-a, RAST-a i APT-a. Od ukupnog broja pozitivnih APT-ova 8 ispitanika (72,7%) bilo je SPT + i RAST +, dva ispitanika (18,2%) bila su SPT – i RAST- (u fazi remisije i egzacerbacije), a jedan ispitanik (9,1%) bio je SPT- i RAST+.

**Tablica 12**

Međudnos kožnog testa ubodom, specifičnog IgE i atopijskog „patch“ testa u ispitanika s atopijskim dermatitisom

	APT +		APT-		Ukupno	
Ispitanici a AD-om	N	(%)	N	(%)	N	(%)
	11	18	50	82	61	100,0
SPT +	8	73	10	20	18	29,5
SPT -	3	27	40	80	43	70,5
RAST +	9	82	14	28	23	40,0
RAST -	2	18	36	72	38	60,0

Svi pozitivni APT-ovi dobiveni su na koncentracije alergena od 20 000 BJ/ml i 30 000 BJ/ml i u vremenu očitavanja od 48h i 72h.

## 5.0. RASPRAVA

Atopijski dermatitis (AD) kronična je, upalna bolest kože udružena s kožnom hiperreaktivnošću prema alergenima okoliša i često prvi je korak u „atopijskom maršu“, koji rezultira pojavom astme ili alergijskog rinitisa (193). Serumski IgE često je povišen u alergijskim bolestima. Mnogi bolesnici s AD-om (80-90%) imaju povišene serumske koncentracije IgE (194). Najviše razine serumskog IgE javljaju se u bolesnika s AD-om koji je udružen s respiratornom alergijom (295). Vezivanjem IgE s antigenima na površini mastocita i bazofila dolazi do oslobađanja medijatora upale i uzrokovanja dermatitisa. Hiperprodukcija IgE u AD-u posljedica je imbalance IL-4 i IFN $\gamma$  koji povećava razinu IL-4, a koji je jak stimulans za stvaranje IgE u B stanicama (177). Postoji udruženost između atopijskog fenotipa i razine serumskog IgE. Povišene ukupne vrijednosti IgE udružene su s povećanom osjetljivošću na virusne i površne gljivične infekcije, osobito pri vrlo visokim vrijednostima (154).

U 345 djece (prosječne dobi 2,9g), istraživana je korelacija težine atopijskog ekcema (definiranog SCORAD mjerilima) i razine serumskog IgE (196). Rezultati su pokazali značajnu korelaciju između SCORAD mjerila i serumskog IgE, odnosno da su serumske koncentracije IgE u korelaciji s težinom bolesti. Studija je pokazala i da su djeca s izraženim AD-om i visokim serumskim IgE rizična skupina za senzibilizaciju na hranu i aeroalergene. (197,198). Primijećeno je da razina serumskog IgE može biti unutar normalnih vrijednosti u blagom obliku AD-a, ali i u nekim slučajevima teškog AD-a. Danas razlikujemo dva oblika AD-a: „ekstrinzični“, odnosno alergijski (70-80% bolesnika), koji nastaje IgE posredovanom senzibilizacijom na alergene okoliša i ima povišenu razinu ukupnog IgE, i „intrinzični“ oblik, odnosno nealergijski (20-30% bolesnika), bez senzibilizacije i s niskom razinom ukupnog IgE

(199,200). Izgleda da postoji dinamičan odnos između ove dvije forme AD-a, a nealergijska varijanta AD-a predstavlja čistu ili prijelaznu formu u prirodnom tijeku AD-a (201). Klase IgE su i autoprotutijela usmjerena protiv antigena humanih proteina koja su nađena u perifernoj krvi i koži bolesnika s AD-om. Ovi autoantigeni označeni su kao *Hom s 1-5* i DSF 70 i klonirani su iz ljudske epitelne citoplazmatske DNA. To su primarni intracelularni proteini nađeni u IgE imunim kompleksima u serumu bolesnika s AD-om (202). Povišene vrijednosti serumskog IgE mogu biti u parazitarnim infekcijama, neoplastičnim bolestima, nekim infektivnim bolestima, mijelomu, hiper IgE sindromu i mnogim drugim stanjima. U naših ispitanika povišen ukupni serumski IgE bio je u 68,9% (42/61) ispitanika, dok u kontrolnoj skupini povišen IgE je bio u 13,3% (4/30) ispitanika, što je statistički značajna razlika. Statistički značajno povišene vrijednosti IgE u serumu dobiveno je i u studiji na 116 odraslih osoba u poređenju s 33 osobe bez atopije i parazitarne infekcije (199). Povišen ukupni serumski IgE je jedan od manjih („minor“) kriterija za dijagnozu AD-a (146).

Normalne vrijednosti IgE neće isključiti alergijsku bolest osobito ako postoji alergija prema jednom alergenu, a povišene serumske koncentracije IgE mogu se naći u mnogih bolesnika koji nemaju alergijske promjene (293). Prospektivna studija Wakomori i sur. pokazala je da se vrijednosti ukupnog IgE-a povećavaju slijedom: najniže vrijednosti su u ispitanika sa zdravom kožom, više vrijednosti su u ispitanika sa suhom kožom, a najviše vrijednosti ukupog serumskog IgE su u ispitanika s atopijskim dermatitisom (204). Povišene serumske koncentracije IgE mogu prethoditi pojavi atopijskih bolesti (204). Određivanje ukupne koncentracije IgE koristan je parametar u procjeni tipa alergijske reakcije (205)

Povišene razine specifičnog IgE (sIgE) za egzogene alergene čest je nalaz u ekstrinzičnom obliku AD-a. Specifični IgE prisutan je u krvi, vezan na površini mastocita i bazofila, a nakon vezivanja s alergenom dolazi do degranulacije, oslobađanja medijatora i upalne alergijske reakcije. Zbog toga sIgE predstavlja faktor rizika za kliničku alergiju kože,



respiratornog i gastrointestinalnog sustava nakon izlaganja alergenu (206). IgE normalno je prisutan u serumu, a specifični IgE može se naći u bolesnika s alergijskom bolešću ali i u oko 15% zdravih osoba bez simptoma alergije (207). AD može se promatrati i kao lokalna manifestacija sistemske bolesti gdje sIgE ima centralnu ulogu (208). Aeroalergni su, osobito grinje kućne prašine (*Dp* i *Df*), značajni faktori u izazivanju, odnosno pogoršanju atopijskog dermatitisa (209). Specifični IgE protiv antigena okoliša može se naći u većine bolesnika s AD-om, skoro sva djeca s udruženom respiratornom alergijom imaju pozitivan RAST na aeroalergene a 80% ih ima pozitivan RAST na alergene hrane (210). U oko 20% djece s „čistim“ AD može se naći sIgE (211). Vrijednosti ukupnog i sIgE, određenih u 102 djece s atopijom, bile su u korelaciji s težinom kožnih i respiratornih simptoma (211). Manja pojava alergijskih bolesti u starijoj dobi može biti posljedica smanjenja ukupne i specifične serumske koncentracije IgE-a. Produkcija ukupnog serumskog i sIgE smanjuje se u starijoj dobi, osim u bolesnika s prethodno jako visokim IgE ili atopijskim dermatitisom (212). Dijagnoza AD moguća je samo ako postoji alergen-specifičan IgE (213).

Skupini sastavljenoj od 114 bolesnika s AD-om, 47 (41,2%) su imali i alergijski rinitis, 36 (31,6%) alergijski konjunktivitisi, a 18 (15,8%) bolesnika je imalo i astmu, određen je i sIgE na alergene: *Dp*, *Df*, bijele breze i dlake mačke (214). Najčešće je sIgE bio povišen na mješavinu *Dp* i *Df* (42,1%). U šezdeset troje djece sa simptomima alergijskog rinitisa i astme, alergičnih na grinje kućne prašine određen je sIgE i SPT (215). Svi ispitanici imalu su visoke koncentracije sIgE i pozitivan SPT na grinje kućne prašine.

U naših ispitanika određen je sIgE prema *Dp*1, jednim od najčešćih aeroalergena koji uzrokuje/pogoršava AD, u fazi remisije i egzacerbacije AD-a te u članova kontrolne skupine. Cilj je bio praćenje dinamike sIgE-a u fazi pogoršanja i poboljšanja kliničke slike AD-a. U fazi remisije AD-a 23% ispitanika imalo je pozitivan sIgE, a u fazi egzacerbacije 26,2% ispitanika s AD-om imalo je pozitivan RAST. Statistički značajna razlika postojala je u

ispitanika s AD-om i u fazi remisije i egzacerbacije u odnosu na članove kontrolne skupine, u kojih nije zabilježen pozitivan sIgE prema *Dp1*. Nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji sIgE u ispitanika s AD-om u fazi remisije i egzacerbacije AD-a.

Kožni test ubodom i sIgE imaju važnu dijagnostičku vrijednost (216). Ovi testovi temelje se na činjenici da osobe senzibilizirane na određeni alergen stvaraju visoke koncentracije sIgE prema tom alergenu (217). Kožni test ubodom otkriva sIgE vezan na površini mastocita i bazofila. Rezultati studija pokazuju da rana kožna reakcija i sIgE prema aeroalergenima imaju ulogu u patogenezi AD-u (218). Senzibilizacija na inhalacione alergene (npr. prašinu, grinje, dlaku životinja i polen) može se otkriti kožnim testom ubodom ili mjerenjem sIgE (176). Tijekom 2001-2002.g urađen je kožni test ubodom na alergene: pelud trava, korova, dlake mačke, dlake psa i na *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Dp 1*) u bolesnika s AD-om (216). Pozitivan sIgE i pozitivan kožni test ubodom nađen je u svih testiranih bolesnika najmanje na jedan alergen. U studiji Guler-a i sur (215) svi ispitanici s rinitisom i astmom, koji su preosjetljivi na grinje kućne prašine, imali su povišen sIgE i pozitivan SPT na grinje kućne prašine. Pozitivan SPT i povišena razina sIgE češća je u bolesnika s AD-om u kojih postoje i druge atopijske bolesti (205). U djece kožni test ubodom ili određivanje sIgE (RAST-CAP metodama) mogu biti važni u otkrivanju IgE posredovane reakcije na alergene hrane. Pri pojavi atopijskog dermatitisa u dječjoj dobi, često nalazimo pozitivan kožni test ubodom i/ili povišene vrijednosti specifičnog IgE protiv najčešćih alergena okoliša ili hrane. U naših ispitanika pozitivan SPT bio je pozitivan na alergene *Dp 1* u 18/61 ispitanika s AD-om (29,5%). Kožni test ubodom je bazičan, siguran i rasprostranjen test za dijagnozu alergija i pozitivni rezultati pokazuju jaku korelaciju s kliničkim simptomima bolesti (219). Klasični testovi, SPT i RAST, koji su vezani za IgE pokazuju pozitivne rezultate u većini bolesnika s AD-om (220).

Mitchel i sur (1982.g.) pokazali su da epikutani „patch“ test s grinjama, u pacijenata s atopijom, može izazvati ekcemsku reakciju (174). AD patogenetski rezultat je suhe kože i ekcematoznih lezija koje su posljedica oštećene zaštitne barijere kože i povećane propusnosti što dovodi do absorpcije alergena okoliša u kožu (208). Novije studije pokazale su da do oštećenja kožne barijere može dovesti: stres (povišenjem endogenih steroida), egzogene proteaze grinja kućne prašine i *Staphylococcus aureus* (208). Alergen specifične T stanice klonirane su iz biopsijom uzetog tkiva s mjesta pozitivnog APT-a. Ove stanice pokazale su značajke Th2 staničnog tipa sekrecije limfokina, dok nakon 48 sati pokazuju Th1 tip sekrecije (180) što nalazimo i u kroničnim lezijama atopijskog ekcema (221). Pozitivan kožni test i/ili povišena razina sIgE protiv aeroalergena značajke su AD-a i prisustva rane alergijske preosjetljivosti (Tip I). Histološke značajke APT-om izazvane ekcemske reakcije potvrđuju uključenost i kasne alergijske reakcije (tip IV). Pojedini autori smatraju da je ključna uloga a IgE posredovane reakcija, neki su skloni dominaciji staničnog imunog odgovora, dok većina smatra uključenost oba alergijska mehanizma u patogenezi AD-a (222). Fabrizi i suradnici bolesnike uključene u studiju podijelili su u 4 skupine u odnosu na vrijednosti sIgE, rezultate SPT-a i APT-a. Prva skupina obuhvaćala je bolesnike u kojih kožne lezije su bile udružene s IgE posredovanim alergijskim mehanizmom (tip I). Oni su imali negativan APT i pozitivan SPT i/ili povišene vrijednosti sIgE. Druga skupina uključivala je bolesnike s pozitivnim APT-om i pozitivnim SPT-om i/ili povišene vrijednosti IgE (tip I i tip IV). Treću skupinu činili su bolesnici samo s pozitivnim APT-om (tip IV). Četvrtu skupinu činili su bolesnici sa svim negativnim testovima (222) i ona ne uključuje niti jedan naprijed navedeni mehanizam. Ova opažanja možda su posljedica potpuno različitih reakcija na pojedine alergene nađene u istog bolesnika (205). Bolesnici s AD-om s pozitivnim epikutanim testom i s malo ili bez sIgE mogu predstavljati slučajeve kroničnog, recidivirajućeg kontaktnog dermatitisa uzokovanog s *Dp*-om ili različitim alergenima okoliša (222). APT

može biti jedini pozitivan kožni test u bolesnika s atopijskim ekcema/dermatitis sindromom (AEDES) ili respiratornim poremećajima udruženim s ili bez AEDES (223). Aeroalergeni imaju značajnu ulogu u pogoršanju ekcema. Potvrđeno je da alergeni koji uzrokuju rani tip alergijske reakcije prolaze kroz oštećenu kožnu barijeru gdje se vežu s Langerhansovim stanicama i bivaju prezentirani T-stanicama. Obzirom da AD prethodi respiratornim alergijama i predodređuje bolesnike ka težem obliku astme, vjeruje se da epikutana senzibilizacija može pokrenuti sistemski alergijski odgovor, koji kasnije može utjecati na tijek astme u dječjoj dobi (224,225). Bolesnici s AEDES pokazuju dva različita alergijska odgovora na alergene, jedan je posredovan s IgE (utvrđuje se pozitivnim SPT-om) i drugi koji je posredovan stanicama (utvrđuje se pozitivnim APT-om) (223). Za APT vjeruje se da je posredovan alergen specifičnim IgE preko Langerhansovih stanica u epidermisu, međutim postoji skupina bolesnika s AEDES koji nemaju sIgE u serumu, a imaju pozitivan APT (226). U šezdeset troje djece s simptomima astme i rinitisa urađen je, pored sIgE i SPT, i APT na grinje kućne prašine (215). Pozitivan APT bio je u 16 ispitanika (25%). Ispitanici s astmom imali su 30% pozitivnih testova (10/33), a u bolesnika s rinitisom pozitivan APT na grinje kućne prašine bio je u 20% ispitanika (6/30) (215). U 109 bolesnika s AD-om određen je ukupni IgE, urađen APT, SPT i sIgE protiv grinja kućne prašine, peludi breze, trava i dlake mačke (205). Pozitivan SPT na alergene grinja nađen je u 57 bolesnika (52,3%), dok je SPT na polen breze, mješavinu trava i dlaku mačke nađen u oko 32,1% (35/109)-35,8% (39/109) bolesnika (205). Povišen sIgE nađen je u 30,2% (pelud breze) do 43,1% (mješavine trava). Pozitivan APT na grinje kućne prašine nađen je u 50 bolesnika (45,8%). Istovremena pojava pozitivnog SPT i/ili povišenog sIgE s negativnim APT dokazuje uključenost alergijskog mehanizma tipa I, u 23,8%-33,9% bolesnika. U 10,1%-28,4% bolesnika uključena su bila oba tipa reakcija (tip I i tip IV). Izolirane alergijske reakcije tipa IV (pozitivan samo APT) najčešće su se javljale na alergene grinja kućne prašine (17,4%) (205).

Ispitujući reaktivitet APT u ispitanika s „ekstrinzičnim“ AD (EAD) (95 muških bolesnika), „intrinzičnim“ AD (IAD) (12 muških bolesnika) i 49 odraslih zdravih osoba, testirano je grinjama kućne prašine; 20% mješavinom *Dp* 50% i *Df* 50% u vazelinu (228). APT bio je pozitivan u 47,4 % ispitanika s EAD, 66,6% u IAD i u 12,2% zdravih osoba. Pozitivitet APT u IAD bio je neočekivan (227). Manzini i sur. testirali su APT-om 313 bolesnika s AD-om i 100 zdravih dragovoljaca s *Dp* i dobili su 39% pozitivnih rezultata u bolesnika s AD-om i 13% pozitivnih rezultata u zdravih ispitanika (228). Primijećeno je pogoršanje dermatitisa tijekom epikutanog testiranja grinjama kućne prašine. Kontaktna senzibilizacija na *Dermatophagoides pteronyssinus* otkrivena je u 20,8% bolesnika s AD-om (174). U 12 centara urađen je APT na veći broj aeroalergena i alergena hrane u 314 bolesnika s AD-om (229). Pozitivan APT na *D. pteronyssinus* dobiven je u 39% ispitanika. APT na aeroalergene urađen je u 115 odraslih bolesnika s AD-om i 98 zdravih osoba (230). APT bio je pozitivan na grinje kućne prašine u 45,2% bolesnika s AD-om. Antigenima grinja kućne prašine testirali su Ito i sur. odrasle osobe s atopijskim dermatitisom (231). Primijenjene koncentracije alergena bile su 0,01, 0,1 i 1,1 mg/ml u fiziološkoj otopini. APT bio je pozitivan u 10% ispitanika s AD-om (231). Učestalost pozitivnih APT-ova u bolesnika s AD-om na alergen *Dp*1 u različitim studijama varira od 10% (231), odnosno 15% do 100% ovisno o različitim testnim tehnikama i odabiru ispitanika (232).

U naših ispitanika APT bio je pozitivan u 18% (11/61) ispitanika, što je nešto niže u odnosu na prosječne vrijednosti u ranijim studijama. Statistički značajno češće pozitivan APT bio je u ispitanika koji su uz AD imali i respiratorne simptome (6,51% u ispitanika s „čistim“ AD-om, a 53,33% u ispitanika s „miješanim“ AD-om). Navedeni rezultati potvrđuju mogućnost epikutane senzibilizacije na *Dp* 1 kao uzroku/pogoršanju respiratorne alergije, što je sugerirano od strane Curtiss FR, 2007. g. (257). Na rezultate APT-a, pored navedene testne tehnike i odabira ispitanika, utjecaj ima i primjena različitih antigenskih pripravaka grinja,

različite koncentracije primijenjenih antigena i pretretman testnog mjesta abrazijom kornealnog sloja kože (233), što pojačava transepidermalnu penetraciju antigena. Pojačana transepidermalna penetracija antigena može znatno povećati broj pozitivnih nalaza u testu, kao i manji stupanj keratinizacije testnog mjesta (npr. nadlaktica) (233). Koža bolesnika s atopijom sklona je iritaciji (233), te u APT-u postoji mogućnost lažno pozitivnih reakcija uzrokovane iritantnom reakcijom, koja se klinički teško razlikuje od alergijske reakcije (234). Većina bolesnika u studijama testirana je alergenima grinja kućne prašine koji imaju aktivnost proteolitičkih enzima kao papain i serin proteaze (235). Oni mogu uzrokovati iritantnu reakciju, koja uz alergijske reakcije, može objasniti visoku učestalost pozitivnih APT na grinje kućne prašine u poređenju s drugim alergenima (236). Primijenjene koncentracije alergena grinja, u APT-u, bile su 10 000 jedinica alergena/ml (232), 500 ili 1000 puta jače od koncentracije u SPT (238,239) te 1000-7000 PNU/g odnosno 200 IR jedinica (IR, prema engl. „*Index of Reactivity*“ ) (228,230,239). Kao podloga većini alergena bio je parafin ili vazelin. Optimalno vrijeme očitavanja APT je 48 i 72 sata, s time da se je najveći broj testova pozitivan nakon 48 sata (239, 240). Prema našim rezultatima APT bio je pozitivan na koncentracije alergena od 20 000 BJ/ml i 30 000 BJ/ml, tako da je optimalna koncentracija *Dp1* u APT 20 000 bioloških jedinica/ml (BJ/ml). APT bio je u većini ispitanika pozitivan nakon 48 sati ( i 72 sata), što je u skladu s ranije objavljenim studijama (239,240). Za koncentracije alergena izražene u PNU/g optimalna koncentracija je 5 000-7 000 PNU/g (241).

APT, SPT i RAST na aeroalergene, uključujući grinje kućne prašine, urađeni su u 73 bolesnika s AD-om i u 38 osoba bez atopije kao kontrolna skupina (242). Pozitivan APT bio je u korelaciji s pozitivnim RAST-om na grinje kućne prašine. Korelaciju APT, ukupnog i sIgE-a pokazuje značajnu ulogu IgE u mehanizmu nastanka pozitivnog APT (232, 240), iako neke studije nisu potvrdile navedenu korelaciju (239). U naših ispitanika s AD-om

postojala je korelacija APT, sIgE i SPT-a. U 11 pozitivnih APT-ova 8 ispitanika (73%) bilo je SPT+ i RAST+. U dva ispitanika bila je prisutna samo stanična imunost (pozitivan APT). To potvrđuje ranija zapažanja da pojedini alergen može uključiti različite mehanizme alergijskih reakcija u istog bolesnika (205). Oba mehanizma preosjetljivosti najčešće se nalazi u preosjetljivosti na alergene kućne prašine (205).

U literaturi malo je podataka o sporednim štetnim efektima primjene APT-a (180). U 253 testirana bolesnika, APT-om, 11 bolesnika imalo je pogoršanje dermatitisa, dva kontaktnu urtikariju, dva bolesnika iritaciju zbog flastera, u dva bolesnika pogoršala se astma i u dvoje bolesnika ispoljila se sistemska alergijska reakcija (239). Upotrijebljeni su alergeni *Dp*, dlaka mačke, pelud trava, pelud breze i pelud pelina, ali nijedna reakcija nije označena kao jaka (239). U 314 bolesnika pri APT-u sporedni štetni efekti pojavili su se u 7,7% bolesnika (243). Većina sporednih efekata bila je blagog stupnja u vidu lokalnog crvenila, kontaktne urtikarije, iritacije athezivnim flasterom i lokalni svrbež (243). U naših ispitanika nisu zabilježene neželjene reakcije tijekom APT-a.

Imunoterapija u alergijskim bolestima obuhvaća davanje rastućih koncentracija specifičnog alergena na koji je bolesnik preosjetljiv. Prije početka specifične imunoterapije alergen mora biti potvrđen SPT i/ili RAST-om (244). Posljednjih godina alergen specifična imunoterapija preporučena je kao jedina etiološka metoda u liječenju koja djeluje na alergijski mehanizam nastanka astme (181)

Terapijski rezultati u djece i adolescenata bolji su nego u odraslih, a primjena SIT u ranoj dobi može promijeniti prirodni tijek astme i spriječiti senzibilizaciju s drugim alergenima (245). Policentrične studije pokazale su da SIT značajno smanjuje simptome i učestalost napada astme (246).

SIT korisna je u liječenju alergijskog rinitisa, alergijske astme i sistemskih reakcija na ubode insekata (247). Novije studije pokazuju da SIT djeluje mijenjajući T staničnu aktivnost

na specifičan alergen (244), odnosno na regulatorne T stanice (T-regs) koje ujednačuju Th1 i Th2 efektorske funkcije (248). Od 58 pedijatrijskih bolesnika s astmom, alegičnih na *Dp*, 32 bolesnika primalo je SIT s ekstraktom *Dp*-a u periodu od jedne godine, a 23 bolesnika tretirano je inhalacijom kortikosteroida u istom vremenskom periodu (181). Smanjenje broja napada astme i poboljšanje pulmonalne funkcije primijećeno je u skupini djece koja su primala SIT. Godinu dana nakon SIT razina Th2 citokina IL-4 bila je smanjena u odnosu na vrijednosti prije SIT, dok je Th1 citokin INF- $\gamma$  bio povišen. SIT popravlja poremećeni balans Th1/Th2, smanjujući serumsku razinu IL-4 i IL-13 u djece s astmom (181)

Uporaba SIT u liječenju AD-a ima dosta nejasnoća. U pojedinim bolesnika dolazi do poboljšanja, dok u nekih bolesnika postoji rizik od pogoršanja bolesti (249). Dobri rezultati primjene SIT u bolesnika s AD-om, preosjetljivih na prašinske grinje, dobiven je u nekim novijim studijama (250,251,252). Studije pokazuju da je sublingvalna SIT sigurna u djece od 5. g starosti, s donjom granicom od tri godine (253).

SIT nije indicirana u liječenju alergije na hranu, jer su moguće ozbiljne anafilaktičke reakcije (249)

Od ukupnog broja ispitanika s AD-om izdvojili smo skupinu od 16 ispitanika koji su primali SIT s alergenom *Dp* 1 u trajanju od najmanje tri godine. Rezultate APT-a u ovih ispitanika uporedili smo s rezultatima APT-a u ispitanika koji nisu primali SIT. APT bio je, statistički značajno češće pozitivan u ispitanika koji su primali SIT (9/16, odnosno 56,3%) u odnosu na ispitanike koji nisu primali SIT (2/45, odnosno 4,4%). Svi ispitanici koji su primali SIT imali su i respiratorne simptome. Niti jedan od ispitanika s AD-om bez respiratornih simptoma nije primao SIT-u. SIT ne djeluje na pozitivitet APT-a obzirom da on ukazuje na prisustvo IgE vezanog na površini Langerhansovih stanica (205), koje kao glavne antigen prezentirajuće stanice u epidermisu, prezentiraju antigen T stanicama i dovode do IgE posredovanog kontaktnog dermatitisa (254). Izgleda da u bolesnika s AD-om u kojih je



prisutna samo kasna reakcija (pozitivan samo APT) nije indicirana SIT. Većina ispitanika s pozitivnim APT imala je pored AD-a i respiratorne simptome („miješani“ AD), odnosno bio je prisutan potpuni tijek tzv „atopijskog marša“ od AD-a do alergijskog rinitisa i astme (255). U naših ispitanika s respiratornim simptomima atopijski dermatitis pojavio se u prve 2 godine života. Sugerirano je da AD predstavlja ulaznu točku („*entry point*“) za alergijske bolesti tako da bi uspješno liječenje AD-a spriječilo pojavu respiratorne alergije ili smanjilo težinu astme i/ili alergijskog rinitisa (255,256). Kožne promjene obično predstavljaju početak atopijskog odnosno „alergijskog marša“. Prema nekim prospektivnim studijama u oko polovice bolesnika s AD-om pojaviti će se astma, a u 2/3 bolesnika pojaviti će se rinitis (257). Smatra se da je za to odgovorna epikutana senzibilizacija s posljedičnim migriranjem senzibiliziranih T stanica u nos i dišne puteve uzrokujući bolest gornjih i donjih dišnih puteva (257). Lowe i sur. primijetili su u svojim bolesnika da izražene kožne promjene i pojava ekcema u prvih 6 mjeseci života predstavlja znatan rizik za pojave astme (258). U većini (87%) naših ispitanika s AD-om i RS („miješani“ AD), respiratorni simptomi javili su se u prve dvije godine života.

## 6.0. ZAKLJUČCI

1. *Dp1* značajan je čimbenik u nastanku/pogoršanju AD-a. U 26,2% bolesnika s AD-om nađen je sIgE na ovaj alergen u fazi egzacerbacije bolesti..
2. Ranu reakciju na *Dp 1* imalo je 29,5% bolesnika s AD-om (pozitivan SPT), kasnu reakciju 18% bolesnika (pozitivan APT), a pozitivnu ranu i kasnu reakciju na *Dp 1* imalo je 13,2% bolesnika (pozitivan SPT i APT).
3. Optimalna koncentracija *Dp 1* u APT je 20 000 Bioloških jedinica/ml (BJ/ml).
4. APT nije test koji se može koristiti u procjeni uspješnosti SIT-e jer on ovisi o staničnoj imunosti i rezultat je iste, a SIT veći utjecaj ima na humoralnu imunost.
5. Nema statistički značajne razlike u serumskoj koncentraciji sIgE u fazi remisije i egzacerbacije AD-a. Postoji statistički značajna razlika u ukupnoj serumskoj koncentraciji IgE u bolesnika s AD-om i članova kontrolne skupine.
6. Pojava AD-a prije respiratornih simptoma preteča je „atopijskog marša“. U svih naših ispitanika AD je prethodio pojavi alergije respiratornog sustava. Većina ispitanika s AD i respiratornim simptomima imala je pozitivan APT (8/15, 53,3%).
7. APT predstavlja vrijedan dijagnostički test koji otkriva IgE na površini Langerhansovih stanica i za IgE vezanu kontaktnu senzibilizaciju. APT predstavlja vrijedan test u otkrivanju čimbenika koji izazivaju/pogoršavaju AD.

## 7.0. SAŽETAK

Cilj rada bio je utvrditi značenje alergena *Dp 1* u bolesnika s AD-om. U studiju je bio uključen 61 bolesnik s AD-om (m: 24, ž: 37, od 18-65 godina starosi, prosječno: 43,33 g). Kontrolna skupina bila je sastavljena od 30 zdravih ispitanika (m:13, ž:17, starosti od 25 do 65 godina, prosječno: 48,63 godine), bez osobne i obiteljske anamneze o atopiji. U svih ispitanika određen je ukupni serumski IgE, specifični IgE prema *Dp 1*, urađen kožni test ubodom i atopijski „patch“ test *Dp 1* kao alergenom (rastuće koncentracije alergena od 3.000, 10.000, 20.000 i 30.000 Bioloških jedinica (BJ/ml)).

Ukupne serumske koncentracije IgE bile su statistički značajno više u bolesnika s AD-om u odnosu na serumske koncentracije IgE u članova kontrolne skupine.

Prema našim rezultatima u ranu reakciju na *Dp 1* (pozitivan SPT i/ili RAST) imalo je 29,5% (18/61) bolesnika, kasna reakcija na *Dp 1* bila je prisutna u 18% (11/61) bolesnika, a 13,2% bolesnika imalo je ranu i kasnu reakciju na *Dp 1*. Većina bolesnika (53,3%) s AD-om i respiratornim simptomima imala je pozitivan APT. *Dp 1*, u ovih bolesnika, značajan je čimbenik koji izaziva i/ili pogoršava AD. Pozitivan rezultat u APT dobiven je na koncentracije alergena od 20000 (i 30000) Bioloških jedinica/ml (BJ/ml), tako da je 20000 BJ/ml optimalna koncentracija u APT-u. Svi rezultati u APT su bili pozitivni nakon 48 (i 72) sata.

Specifična imunoterapija predstavlja jedini tretman koji djeluje etiološki na alergijska zbivanja, ona popravljiva poremećen odnos T regulatornih i T efektorskih stanica u bolesnika s atopijskim bolestima. Izdvojena skupina od 15 naših ispitanika (m: 4, ž: 11) koja je primala SIT-u s *Dp 1* kao alergenom u trajanju od najmanje tri godine. Nije nađen smanjen pozitivitet APT-a, nakon SIT-e u ovih bolesnika. U bolesnika koji su primali SIT dobiveno je 56,3%

pozitivnih APT-a, tako da isti nije primjeren za procjenu uspješnosti SIT-a. U svih naših bolesnika s respiratornim simptomima AD je prethodio pojavi respiratorne alergije („atopijski marš“). Prateći dinamiku sIgE, metodom RAST-a, nije utvrđena statistički značajna razlika u serumskoj koncentraciji sIgE u fazi remisije i egzacerbacije AD-a.

Rana pojava kožnih promjena AD-a, povećava rizik od pojave rinitisa i astme u kasnijoj životnoj dobi i predstavlja početak „atopijskog marša“.

*Dp 1* predstavlja jedan od najvažnijih aeroalergena koji uzrokuje i/ili pogoršava AD. APT je vrijedan dijagnostički test u otkrivanju alergena koji uzrokuju i pogoršavaju AD i koji treba biti uključen u kliničku obradu bolesnika s AD-om.

## 8.0. SUMMARY

Sixty one patients, (m:24, f:3, mean age: 43,33 years, range:18 to 65 years), with atopic dermatitis were involved in the study. The control group consisted of thirty subjects (m:13 f:17, mean age: 48,63 years, range: 25 to 65 years), without personal or family history of atopy. The aim of the study were to evaluate the role of *Dp 1* in AD patients using: total serum IgE, specific serum IgE to *D p1*, skin prick test, and atopy „patch“ test using *Dp1* as allergen, (increasing doses from 3000 BU/ml, 10000, 20000 and 30000 BU/ml).

According to our results 18% (11/61) AD patients have positive „late reactions“ and „immediate allergic“ reaction to *Dp1* in 29,5% (18/61) AD patients was positive. It is concluded that *Dp 1* is important „trigger“ factor in those AD patients. APT, with SPT and sIgE, is valuable test which can detect „trigger“ factor(s) in AD patients.

It was found that sIgE has no correlation with remission or exacerbation of the AD.

SIT represents the only curative treatment of allergy, she restores disturbed balance of T-regs and T effector cells in allergic patients. In the presented study a subgroup of patients (n:15, m:4, f:11) received SIT (*Dp 1*) for at least three years. According to results SIT does not decrease APT reactivity, so this test is not valuable in estimating SIT success.

Early onset of AD (up to 2 years of old), precedes a development rhinitis and allergic asthma in childhood or later. More positive APT results noted in „mixed“ AD patients.

## 9.0. LITERATURA

1. Čulo F. Organizacija imunološkog sustava. U: Andreis I, Čulo F, Marušić M, Taradi M. Imunologija. 5. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb 1998; str. 46-135
2. Suster S, Rosai J. Hystology of the normal thymus. Am J Surg Pathol 1990;14:284-303
3. Nishino M, Ashiku KS, Kocher NO, Thurer LR, Boiselle MP, Hatabu H. The Thymus: A Comprehensive Review. Radiographics 2006;26:335-48
4. Shimosato Y, Mukai K. Tumors of the thymus and related lesions. In: Shimosato Y, Mukai K, eds. Atlas of tumor pathology: tumors of the mediastinum. Ser. 3, Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1997;p.158-168
5. Ekino S, Suginojara K, Urano T, Fujji H, Matsuno K, Kotani M. The bursa of Fabricius:a trapping site for environmental antigens. Immunology 1985;55:405-10
6. Carsetti R. The Development of B Cells in the Bone Marrow Is Controlled by the Balance Between Cell-Autonomous Mechanisms and Signals from the Microenvironment. J Exp Med 2000;191(1):5-8
7. Willard-Mack CL. Normal Structure, Function, and Histology of Lymph Nodes. Toxicol Pathol 2006;34(5):409-24
8. Elmore S. Enhanced Histopathology of the Lymph Nodes. Toxicol Pathol 2006;34(5):634-47
9. Cesta FM. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. Toxicol Pathol 2006;34(5):455-65
10. Saito H, Yokoi Y, Watanabe S, Tajima J, Kuroda H, Namihisa T. Reticular meshwork of the spleen in rats studied by electron microscopy. Am J Anatom 1988;181:235-52
11. Cesta FM. Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. Toxicol Pathol 2006;34:599-608

12. Spiskett GP, Schwarz T. Clinical Immunology, Allergy and Photoimmunology. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C eds, Rook's Textbook of Dermatology, 7<sup>th</sup> ed, Blackwell Publishing, 2004; p. 10.1-37
13. Rolink AG, Massa S, Balciunaite G, Ceredig R. Early lymphocyte development in bone marrow and thymus. *Swiss Med Wkly* 2006;136:679-83
14. Delves I, Roitt IM. The Immune System. *N Engl J Med* 2000;343(1):37-49
15. Weinreich MA, Hogquist KA. Thymic Emigration: When and How T cells Leave Home. *J Immunol* 2008;181: 2265-70
16. Stobo JD. Limfociti. U: Osnovna i klinička imunologija. Stites DP, Stobo JD, Wells JV, eds; prijevod Dekaris D i sur. Savremena administracija, Beograd 1989; str. 65-80
17. Kaufmann SHE.  $\gamma/\delta$  and other unconventional T lymphocytes: What do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:2272-9
18. Germain RN, Stefanova I. The dynamic of T cell receptor signaling complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol* 1999;17:467-522
19. Hudrisier D, Bongrand P. Intercellular transfer of antigen-presenting cell determinants into T cells: molecular mechanisms and biological significance. *FASEB J* 2002;16:477-86
20. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis M, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999;285:221-7
21. Lee KH, Holdorf AD, Dustin ML, Chan AC, Allen PM, Shaw AS. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 2002;295:1539-42
22. Monks KH, Freiberg BA, Kupfer H, Seiaku N, Kupfer A. Threedimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 1998;395:82-6
23. Thauland TJ, Koguchi Y, Wetzel SA, Dustin ML, Parker DC. Th1 and Th2 Cells Form

- Morphologically Distinct Immunological Synapses. *J Immunol* 2008;181:393-9
24. Huppa JB, Davis MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2003;3: 973-83
25. Marušić M. Tijek imunološke reakcije. U: Andreis I, Čulo F, Marušić M, Taradi M. *Imunologija*. 5. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb 1998; str. 222-47
26. Curtsinger JM, Lins DC, Mescher ME. Signal 3 determines Tolerance versus Full Activation of Naive CD8 T cells. Dissociating Proliferation and Development of Effector Function. *J Exp Med* 2003;9:1141-51
27. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 2006;126:32-41
28. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldestein H, Convit RL, Modlin RL, Bloom BR. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991;254:279-82
29. Kurts C. Th 17 cells: a third subset of CD4+ T effector cells involved in organ-specific autoimmunity. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:816-9
30. Gagro A. Novel concepts in immunology and their application in clinical allergology. *Rad Med Sci, Zagreb* 2008;499:67-76
31. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-36
32. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004;21:467-76.
33. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73
34. Youinou P, Hillion S, Jamin C, Pers JO, Saraux A, Renaudineau Y. B lymphocytes on the front line of autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2006;5:215-21



35. Camacho SA, Kosco-Vilbois MH, Berek C. The dynamic structure of the germinal center. *Immunol Today* 1998;19:511-4
36. Wang LD, Clark MR. B-cell antigen-receptor signaling in lymphocyte development. *Immunology* 2003;110:411-20
37. Haxhinasto SA, Bishop GA. Synergistic B Cell Activation by CD40 and the B cells Receptor. *J Biol Chem* 2004;279(4):2575-82
38. Youinou P, Jamin C, Lydyard PM. CD5 expression in human B-cell population. *Immunol Today* 1999;20:312-6
39. Pers JO, Jamin C, Youinou P, Charreire J. Role of IL-10 in the distribution of B cell subset in the mouse B-1 cell population. *Eur Cytokine Netw* 2003;14(3):178-85
40. Vigna AFG, Godoy LC, de Almeida R, Mariano M, Lopes JD. Characterization of B-1b cells as antigen presenting cells in the immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro. *Immunol Letters* 2002;83:61-6
41. Garcia-Penasrubia P, Koster FT, Kelley RO, McDowell TD, Bankhurst AD. Antibacterial activity of human natural killer cells. *J Exp Med* 1989;169:99-113
42. Agrawai S, Tripathi P, Naik S. Roles and Mechanism of Natural Killer Cells in Clinical and Experimental Transplantation. *Expert Rev Clin Immunol* 2008;4(1):79-91
43. See DM, Khemka P, Sahl L, Bui T, Tilles JG. The Role of Natural Killer Cells in Viral Infections. *Scand J Immunol* 1997;46:217-24
44. Seino K, Taniguchi M. NKT Cells: A Regulator in Both Innate and Acquired Immunity. *Curr Med Chem* 2005;4:59-64
45. Salcedo TW, Azzoni L, Wolf SF, Perussia B. Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *J Immunol* 1993;151:2511-20
46. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22(11):633-40

47. Morel PA, Oriss TB. Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Crit Rev Immunol* 1998;18(4):275-303
48. Ashton-Rickardt, Opferman JT. Memory T lymphocytes. *Cell Mol Life Sci* 1999;56:69-77
49. Zinkernagel RM. What is missing in immunology to understand immunity? *Nat Immunol* 2000;1:181-5
50. Kalia V, Sarkar S, Gourley TS, Rouse BT, Ahmed R. Differentiation of memory B and T cells. *Curr Opin Immunol* 2006;18:255-64
51. Sallusto FD, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401:708-12
52. Stuart LM, Ezekowitz RAB. Phagocytosis: Elegant Complexity. *Immunity* 2005;22:539-50
53. Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005;175(3):1373-81
54. Turka LA, Nickoloff BJ. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today* 1994;15(10):464-9
55. Kosiewicz MM, Alard P. Tolerogenic antigen-presenting cells: regulation of the immune response by TGF-beta-treated antigen-presenting cells. *Immunol Res* 2004;30(2):155-70
56. Colonna M, Krug A, Cella M. Interferon-producing cells: on the front line in immune response against pathogens. *Curr Opin Immunol* 2002;14:373-9
57. Reid CD. The dendritic cell lineage in haemopoiesis. *Brit J Haematol* 1997;96:217-23
58. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T. Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *J Invest*

- Dermatol 1996;106:446-53
59. Bieber T. Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 2008;358:1483-94
  60. Shortman K, Caux C. Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem cells* 1997; 15:409-19
  61. Naito M. Macrophage Heterogeneity in Development and Differentiation. *Arch Histol Cytol* 1993;56(4):331-51
  62. Karisson KR, Cowley S, Martinez FO, Shaw M, Minger SL, James W. Homogenous monocytes and macrophages from human embryonic stem cells following coculture-free differentiation in M-CSF and IL-3. *Exp Hematol* 2008;36(9-2):1167-75
  63. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 1972;46:845-52
  64. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol* 2007;82:244-52
  65. Gordon S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* 2007;37:S9-17
  66. Walzog B, Gaetgens P. Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. *News Physiol Sci* 2000;15:107-13
  67. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli. Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Lab Invest* 2000;80(5):617-54
  68. Abdel-Latif D, Steward M, Lacy P. Neutrophil primary granule release and maximal superoxide generation depend on Rac2 in a common signalling pathways. *Canad J Physiol Pharmacol* 2005;83:69-75
  69. Fouret P, Du Bois RM, Bernaudin JF, Takahashi H, Ferrana VJ, Crystal RG. Expression of the neutrophil elastase gene during human bone marrow differentiation. *J Exp Med*

1989;164:833-45

70. Bochner BS. Road signs guiding leukocytes along the inflammation superhighway. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:817-28
71. Rothenberg ME, Hogan SP. The Eosinophil. *Ann Rev Immunol* 2006;24:147-74
72. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997;77:1033-79
73. Gurish MF, Austen F. The Diverse Roles of Mast cells. *J Exp Med* 2001;194(1):1-5
74. Marshall JS, Jawdat DM. Mast cells in innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:21-7
75. Mekori YA. The mastocyte: The „other“ inflammatory cell in immunopathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:52-7
76. Falcone FH, Haas H, Gibbs BF. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood* 2000;96:4028-38
77. MacGlashan Jr D. New roles for basophils. *Immunol Cell Biol* 2008;86:637-8
78. Buckley MG, McEuen AR, Walls AF. The return of the basophil. *Clin Exp Allergy* 2002;32:8-10
79. Zajac AK, Rogala B. Platelet function in anaphylaxis. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2006;16(1):1-4
80. Pitchford SC. Defining a role for platelets in allergic inflammation. *Inflammation* 2007;35:1104-8
81. Frick LO. Rana preosjetljivost. U: Osnovna i klinička imunologija. Stites DP, Stobo JD, Wells JV, eds; prijevod Dekaris D i sur. Savremena administracija, Beograd 1989; str. 65-80
82. Xie H, Shao-Heng H. Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2005;11(19):2851-7
83. Stark H. Histamine Receptors. *Biotrend Rev* 2007;1:1-9

84. Schwartz JC, Arrang JM, Garbag M, Pollard H, Ruat M. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev* 1991;71:1-51
85. Steinhoff M, Griffiths CEM, Church MK, Luger TA. Inflammation, In *Rook's Textbook of Dermatology*, 7th ed., Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C eds, Blackwell Scientific Publ, Oxford 2004; p 9.1-55
86. Folco G, Murphy RC. Eicosanoid Transcellular Biosynthesis: from Cell-Cell Interaction to in Tissues Responses. *Pharmacol Rev* 2006;58:375-88
87. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, Evanson K, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *PNAS* 2002;99:13926-31
88. O'Connor JP, Lusz T. Celecoxib. NSAIDs and the skeleton. *Drugs Today* 2008;44(9):693-709
89. Hamberg M. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci* 1975;72(8):2994-8
90. Strait R, Morris SC, Finkelman FD. Cycrocine enhancement of anaphylaxis. *Novartis Found Symp* 2004;257:80-91
91. Jegels MA, Hugli TE. Neutrophil chemotactic factors promote leukocytosis. A common mechanism for cellular recruitment from bone marrow. *J Immunol* 1992;148(4):1119-28
92. Walport M, Bhoola KD, Elson CJ, Dieppe PA. Kinins-Key Mediators in Inflammatory Arrthritis? *Rheumatology* 1992;31(8):509-18
93. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999;9:825-57
94. Feldman M, Vilček J. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(4):201-8
95. Curfs JHAJ, Meis JFGM, Hoogkamp-Korstanje JAA. A Primer on Cytokines: Sources, Receptors, Effects, and Inducers. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(4):742-80

96. Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Aria N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 1990;59:783-836
97. Oppenheim J, Rusetti FV, Fatyneu C. Interferoni i interleukini. U: Osnovna i klinička imunologija. Stites DP, Stobo JD, Wells JV, eds; prijevod Dekaris D i sur. Savremena administracija, Beograd 1989;
98. Nickel R, Beck LA, Stellato C, Schleimer RP. Chemokines and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:723-42
99. Rottman JB. Key Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation, Immunity, Neoplasia, and Infectious Disease. *Vet Pathol* 1999;36:357-67
100. Shankarkumar U. The Human Leukocyte Antigen (HLA) System. *Int J Hum Genet* 2004;4(2):91-103
101. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogenic system. *Nature* 1974;248:701-2
102. Marušić M. Geni i antigeni tkivne podudarnosti. U: Andreis I, Čulo F, Marušić M, Taradi M. *Imunologija*. 5. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb 1998; str.194-23
103. Mitchell GF, Miller JFAP. Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med* 1968;128:821-837
104. Dekaris D. Temeljna alergologija. Školska knjiga, Zagreb 1983; str 6-26
105. Borghesi L, Milearek C. From B cell to plasma cell: regulation of V(D)J recombination and antibody secretion. *Immunol Res* 2006;36(1-3):27-32
106. Taradi M. Građa i svojstva protutijela. U: Andreis I, Čulo F, Marušić M, Taradi M. *Imunologija*. 5. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb 1998; 151-82
107. Goodman JW. Imunoglobulini I: Struktura i funkcija: Osnovna i klinička imunologija.

- Stites DP, Stobo JD, Wells JV, eds; prijevod Dekaris D i sur. Savremena administracija, Beograd 1989
108. Silobrčić V. Imunost na infekcije. Saopćenja 1980;1:49-76
109. Marušić M. Imunološko prepoznavanje, JUMENA, Zagreb 1980; str.45-82
110. Clark M. General Introduction, in Birch JS, Lennox E (eds): Monoclonal antibodies: Principles and applications, John Wiley and Sons, 1995: p. 1-43
111. Mayumu M, Kuritani T, Kubagawa H, Kooper MD. IgG subclass expression by human B lymphocytes and plasma cells: B lymphocytes precommitted to IgG subclass can be preferentially induced by polyclonal mitogens with T cell help. J Immunol 1983; ;130(2):671-7
112. Madero MF, Sastre J, Carnes J, Quirce S, Herrera-Pombo JL. IgG4-mediated allergic reaction to glargine insulin, Allergy 2006;61:1022-3
113. Fridman WH. Fc receptors and immunoglobulin binding factors. FASEB J 1991;5: : 2684-90
114. Ravetch JV. Fc receptors: Rubor Redux, Cell 1994;78:553-60
115. Snoeck V, Peters IR, Cox E. The IgA system: a comparasion of structure and function in different species. Vet Res 2006;37(3):455-67
116. Kazeeva TN, Shevelev AB. Unknown Functions of Immunoglobulins A. Biochemistry 2007;72(5):485-94
117. Scott DW, Layton JE, Nassal GJV. Role of IgD in immune response and tolerance. 1. Anti-delta pretreatment facilitates tolerance induction in adult B cells in vitro. J Exp med 1977;146:1473-83
118. Heyman B. Feedback regulation by IgG antibodies. Immunol Lett 2003;88(2):157-61
119. Vinter EW, Hardt NS, Fuhrman S. Immunoglobulin E. Importance in Parasite Infections and Hypersensitivity Responses. Arch Pathol Lab Med 2000;124:1382-5

120. Carroll MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* 2004;5:981-6
121. Law SK, Lichtenberg NA, Levine RP. Covalent binding and hemolytic activity of complement proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:7194-8
122. Reid K, Turner M. Mammalian lectins in activation and clearance mechanisms involving the complement system. *Semin Immunopathol* 1994;15:307-26
123. Cooper NR. Sistem komplementa. U: Osnovna i klinička imunologija. Stites DP, Stobo JD, Wells JV, eds; prijevod Dekaris D i sur. Savremena administracija, Beograd 1989; str. 113-25
124. Coombs PR, Gell PG. *Clinical Aspects of Immunology*. Gell RR Ed. Oxford, Oxford University Press 1968; p 575-699.
125. Andreis I. Imunološke preosjetljivosti. U: Andreis I, Čulo F, Marušić M, Taradi M. *Imunologija*. 5. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb 1998; str. 423-34
126. Sreevastava DK, Tarneja VK. Anaphylactic reaction. *MJAFI* 2003;59:53-6
127. Descotes I, Choquet-Kastylevsky. Gell and Coombs classification is it still valid? *Toxicology* 2001;158:43-9
128. De Shazo RD, Kemp SF. Allergic reactions to drug and biologic agents. *JAMA* 1997;278:1895-906
129. Contreras CE, Orozco A, Sanchez P, Ortega G, Bianco NE. Physiological aspects of circulating immune complexes in the normal population. *Clin Exp Immunol* 1982;48(3):693-9
130. Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Immune complexes in human diseases: a review. *Am J Pathol* 1980;100(2):529-94
131. Rouchowdury S, Svensson CK. Mechanisms of drug induced delayed hypersensitivity reactions in the skin. *AAPJ* 2005;7:E834-46



132. Shushakova N, Skokova J, Schulman J et al. C5a anaphylatoxin is a major regulator activating versus inhibitory FcγRs in immune complex-induced lung disease. *J Clin Invest* 2002;110:1823-30
133. Brucner AL, Weston WL, Morelli JG. Does sensitization to contact allergens begin in infancy? *Pediatrics* 2000;105:3-6
134. Marks JG Jr, DeLeo VA, Eds. *Contact and Occupational Dermatology*, 2<sup>nd</sup> ed, St Louis Mosby year book, 1997;3-14
135. Pichler WJ. Delayed drug Hypersensitivity reactions . *An Int Med* 2003;139:683-93
136. Roitt MJ. *Temeljna imunologija*. 3. izdanje JUMENA, Zagreb,1987; 47-100
137. Hasmann O, Schnyder B, Pichler WJ. Drug Hypersensitivity Reactions Involving Skin. *Handb Exp Pharmacol* 2010;196:29-55
138. Adams DO. The granulomatous inflammatory response. A review. *Am J Pathol* 1976;84:164-91
139. MacLean JA, Eidelman F. The genetics of Atopy and Atopic Dermatitis. *Arch Dermatol* 2001;137:1474-6
140. Weinberg EG. The Atopic March. *Curr Allergy Clin Immunol* 2005;18(1):4-5
141. Kjellman NIM, Croner S. Cord blood IgE determination for allergy prediction – a follow-up to seven years of age in 1651 children. *Ann Allergy* 1984;53:161-71
142. Fergusson D, Horwood L, Shannon F. Early solid feeding and recurrent childhood eczema, a 10 year longitudinal study. *Pediatrics* 1990;86:541-6
143. Boguniewicz M, Leung DYM. Atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(Suppl):S475-80
144. Leung DYM, Bhan AK, Schneeberger EE, Geha RS. Characterisation of the mononuclear cell infiltrate in atopic dermatitis using monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1983;71:47-50

145. Lipozenčić J, Lugović L. Novosti u etiopatogenezi i liječenju atopijskog dermatitisa. *Pediatr Croat* 2001;45 (suppl 1):175-81
146. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Dermato Venereol* (Stockh) 1980;71:47-50
147. Ou LS, Huang JL. Cellular aspects of atopic dermatitis . *Clin Rev Allergy Immunol* 2007;33:191-8
148. Cooper KD. Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and treatment. *J Invest Dermatol* 1994;102:128-37
249. Lee YA, Wahn U, Kehrt R, Terani L et al. A major susceptibility locus for atopic dermatitis maps to chromosome 3q21. *Nat Genet* 2000;26:470-3
150. Cookson WO, Ubhi B, Lawrence R et al.. Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat Genet* 2001;27:372-3
151. Haagerup A, Bjerke T, Schiøtz PO et al. Atopic Dermatitis- a Total Genom-scan for Susceptibility Genes. *Acta Derm Venereol* 2004;84:346-352
152. Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol* 2004;4:978-88
153. Barnes CK. An update on the genetics of atopic dermatitis: Scratching the surface in 2009. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:16-29).
154. Kang 154. K, Stevens RS. Pathophysiology of Atopic Dermatitis. *Clinics Dermatol* 2003;21:116-21).
155. Johansson SG, Bieber T, Dahl R et al. Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:832-6
156. Maintz L, Novak N. Getting more and more complex: the pathophysiology of atopic eczema. *Eur J Dermatol* 2007;17:267-83

157. Seiberler S, Natter S, Hufnagl P, Binder BR, Valenta R. Characterisation of IgE-reactive autoantigens in atopic dermatitis. 2. A Pilot study on IgE versus IgG subclass response and seasonal variation of IgE autoreactivity. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;120(2):117-25
158. Šofranac M. Correlation between allergic rhinitis, asthma, and atopic dermatitis in children. *Pediatrics* 2008;121:S91
159. Druce HM. Allergic and nonallergic rhinitis. In: Middleton EM Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW, Eds. *Allergy: Principles and Practice*. 5<sup>ed</sup>. St Louis, Mo: Mosby Year-Book; 1998:1005-16
160. Vance GHS, Holloway JA. Early life exposure to dietary and inhalant allergany. *Ped Allergy Immunol* 2002;13:14-9
161. Smith MR, Harding LK, Cumming G. The changing prevalence of asthma in school children. *Clin Allergy* 1971;1:57-61
162. Ivković-Jureković I. Astma-Epidemiologija, čimbenici rizika i patofiziologija. *Pediatr Croat* 2006;50:1-16
163. Suggars AL. House Dust Mites: A Review. *J Entomol Sci Suppl* 1987;1:3-15
164. de Blay F, Heymann PW, Chapman MP, Platts-Mills TA. Airborne dust mite allergens: comparison of group II allergens and group I mite allergen and cat allergen Fel d I. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:919-26
165. Thomas WR, Smith WA, Hales BJ, Mills KL, O'Brien RM. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129(1):1-18
166. Werghofer M, Thomas WR, Kronqvist M et al. Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients. *Eur J Clin Invest* 2008;38(12):959-65
167. Kanceljak-Macan B. Suvremeni pogledi na alergijske bolesti. *Arh Hig Rada*

- Toksikol 2004;55:123-34
168. Gendo K, Larson FB. Evidence-based diagnosis strategies for evaluating suspected allergic rhinitis. *Ann Int Med* 2004;140:278-9
169. Rusznak C, Davies R. Diagnosing allergy. *BMJ* 1998;316:686-9
170. Høst A, Andrae S, Charkin S et al. Allergy testing in children: why, who, when and how? *Allergy* 2003;58:559-69
171. Jonker MJ, Bruynzeel DP. The outcome of an additional patch test reading on day 6 or 7  
*Contact Dermatitis* 2000;42:330-5
172. Kraft S, Bieber T. FcεRI-Mediated Activation of Transcription Factors in Antigen-Presenting Cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:9-15
173. Giménez JCM. Atopic dermatitis. *Alergol Immunol Clin* 2000;15:279-95
174. Mitchel E, Crow J, Chapman, Jouhal SS, Platts-Mills TA. Basophils in allergen-induced patch sides in atopic dermatitis. *Lancet* 1982;1:127-30
175. Moller C, Bjorksten B, Nilsson G, Dreborg S. The precision of the conjunctival provocation test. *Allergy* 1984;39(1):37-41
176. Lipozenčić J, Wolf R. Atopic dermatitis: an update and review of the literature. *Dermatologic Clinics* 2007;25(4):605-12
177. Klein PA, Clark RA. An evidence-based review of the efficacy of antihistamines in relieving pruritus in atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 1999;135:1522-5
178. Doherty V, Sylvester D, Kennedy C, Hervey SG. Treatment of itching in atopic eczema with antihistamines with low sedation profile. *BMJ* 1989;298:96
179. Stevens SR, Hanifin JM, Hamilton T, Tofte SJ, Cooper KD. Long-term effectiveness and safety of recombinant human interferon gamma therapy for atopic dermatitis despite unchanged serum IgE levels. *Arch Dermatol* 1998;134:613-6
180. Buys LM, Treatment Options for Atopic Dermatitis. *Am Fam Physician* 2007;75:

:523-8

181. Spergel JM, Leung DYM. Safety of topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis: evaluation on evidence. *Curr Allergy Asthma Rep* 2006;6:270-4
182. Higaki S, Morohashi M, Yamagishi T, Hasegawa Y. Comparative study of staphylococci from the skin of atopic dermatitis patients and from healthy subjects. *Int J Dermatol* 1999;38:265-9
183. Cheng ZG, Li YF, Ji JZ et al. Effects of *dermatophagoides pteronyssinus* allergen-specific immunotherapy on the serum interleukin-13 and pulmonary function in asthmatic children. *Chin Med J* 2009;122(10):1157-61
184. Grembiale RD, Camporota L, Naty S, Tranfa CM, Djukanovic R, Marsico SA. Effects of specific immunotherapy in allergic rhinitis individuals with bronchial hyperresponsiveness. *Amm J Resoir Crit Care Med* 2000;162:2048-52
185. Huggins JL, Looney RJ. Allergen Immunotherapy. *Am Pham Phisician* 2004;70:689-96
186. Des Roches A, Paradis L, Menardo JL, Bouges S, Daures JP, Bousquet J. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagooides pteronyssinus* extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:450-3
187. Werfel T, Breuer K, Ruéff F et al. Usefulness of specific immunotherapy in the patients with atopic dermatitis and allergicsensitization to house dust mites: a multi-centre, randomized, dose-response study. *Allergy* 2006;61:202-5
188. Pajno GB, Caminiti L, Vita D et al. Sublingual immunotherapy inmite-sensitized children with atopic dermatitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:164-70
189. Kerschenlohr K, Darsow U, Burgdorf WCH, Ring J, Wollenberg A. Lessons from Atopy Patch Testing in Atopic Dermatitis. *Curr Sc* 2004; 4:

:185-9

190. Ritschel LR, Fowler JF Jr. Fischer's Contact Dermatitis. 4<sup>th</sup> ed, Williams & Wilkins; Baltimore Waverly Company, 1995: p21-32
191. STATISTICA for Windows [Computer program]. Version 8,0 Tulsa, (OK, USA): Stat Soft, Inc 2000
192. Ivanković D i sur. Osnove statističke analize za medicinare. Biblioteka udžbenici i priručnici Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, svezak 24, Zagreb 1988
193. Leung YMD, Boguniewicz M, Howell DM, Nomura I, Hamid AQ. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 2004;113(5):651-7
194. Demis BJ. Atopic dermatitis. In: Demis DJ, Thiers BH, Burgdorf WHC et al. Eds. *Clinical Dermatology*. 19<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Pa: Lippincott; 1992: p 13.
195. Wuthrich B, Fuchs W. Serum IgE levels in atopic diseases in childhood. *Helv Pediatr Acta* 1979;34:537-44
196. Laske N, Niggemann B. Does the severity of atopic dermatitis correlate with serum IgE levels? *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15(1):86-8
197. Johnson E, Irons J, Patterson R. Serum IgE concentration in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1975;55:256-67;
198. Worm M, Henz BM. Molecular regulation of human IgE synthesis. *J Mol Med* 1997;75(6):440-7
199. Wüthrich B. Serum IgE in atopic dermatitis: relationship to severity of cutaneous involvement and course of disease as well as coexistence of atopic respiratory diseases. *Clin Allergy* 1978;8(3):241-8
200. Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:252-62
201. Novembre E, Cianferoni A, Lombardi E, Bernardini R, Pucci N, Vierucci A. Natural

- history of „intrinsic“ atopic dermatitis. *Allergy* 2001;56:452-3
202. Valenta R, Natter S, Seiberler S, et al. Molecular characterization of an autoallergen, hom s 1, identified by serum IgE from atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol* 1998;111:1178-83
203. Sinclair D, Peters AS. The predictive value of total serum IgE for a positive allergen specific IgE result. *J Clin Pathol* 2004;57:956-9
204. Wakomori T, Katoh N, Hirano S, Kishimoto S, Ozasa K. Atopic Dermatitis, Dry Skin and Serum IgE in Children in a Community in Japan. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149:103-10
205. Samochocki Z, Owczarek W, Rujna P, Raczka A. Hypersensitivity to aeroallergens in adult patients with atopic dermatitis develop due to the different immunological mechanisms. *Eur J Dermatol* 2007;17(6):520-4
206. Ahlstedt S, Murray SC. In vitro diagnosis of allergia: how to interpret IgE antibody results in clinical practice. *Prim Care Respir J* 2006;15:228-36
207. Lavins BJ, Dolen WK, Nelson HS, Weber RW. Use of standardized and conventional allergen extracts in prick skin testing. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:658-66
208. Sehra S, Holbreich M, Kaplan M, Tuana FMB, Mousdicas N, Travers JB. Clinical correlations of recent developments in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Ann Bras Dermatol* 2008;83(1):57-73
209. Fox A. House-dust mites, the atopy patch test and caring for the patients with atopic dermatitis. *Curr Allergy Clin Immunol* 2005;18(3):108-1
210. Somani KV. A study of allergen-specific IgE antibodies in Indian patients of atopic dermatitis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2008;74:100-4
211. Wüthrich B, Benz A, Skvaril E. IgE and IgG4 levels in children with atopic

- dermatitis. *Dermatologica* 1983;166:229-35
212. Mediaty A, Neuber K. Total and specific serum IgE decreases with age in patients with allergic rhinitis, asthma and insect allergy but not in patients with atopic dermatitis. *Immunity Ageing* 2005;2:9-14)
213. Bos JD. Atopiform dermatitis. *Br J Dermatol* 2002;147(3):426-9)
214. Owczarek W, Targowski T, Paluchowska E. Relationship between serum level of specific IgE antibodies and atopy patch test results in patients with atopic dermatitis. *Int Rev Allergol Clin Immunol* 2009;15(1-2):11-7
215. Guler N, Kirerleri E, Tamay Z, Ones U. Atopy patch testing in children with asthma and rhinitis symptoms allergic to house dust mite. *Pediatr All Immunol* 2006;17(5):346-50
216. Milavec-Puretić V, Lipozenčić J, Žižić V, Milavec D. Correlation Among Skin Prick Test, Total and Specific IgE UniCAP Tests in Atopic Patients from Zagreb, Croatia. *Acta Dermatovenerol Croat* 2004;12(4):257-60
217. Skitarelić N, Mišulić J, Skitarelić N, Vuletić A, Troskot V. Vrijednosti laboratorijskih testova za dokaz preosjetljivosti kod bolesnika s pozitivnim kožnim testom na kućnu prašinu i grinje. *Med Jad* 2009;39(1-2):13-18
- 218 Buysnl Koomen CA, VanVichen DF, Spry CJ, Venge P, Bruynzzel PL. Active participation of eosinophils in patch test reactions to inhalant allergens in patients with atopic dermatitis. *Brit J Dermatol* 1988;118(2):229-38
219. Bousquet J. In vivo methods for study of allergy: skin test techniques and interpretation. In: Middleton E, Reed CE, Ellis FF, Eds. *Allergy principles and practise*. St Louis: CV Mosby, 1998;p 420-6
220. Ring J, Darsow U, Abeck D. The atopy patch test as a method of studying aeroallergens as triggering factors of atopic aczema. *Dermatol Tretmant* 1996;1:51-60



221. Werfel T, Morita A, Grewe M et al. Allergen-specificity of skin-infiltrating T-cells is not restricted to a type 2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1996;107:871-6
222. Fabrizi A, Romano P, Vultaggio P, Bellegrandi S, Paganelli R, Venuti A. Heterogeneity of atopic dermatitis defined by the immune response to inhalant and food allergens. *Eur J Dermatol* 1999;9(5):380-4
223. Fuiano N, Incorvaia C, Prodam F, Procaccini D, Bona G. Relationship between the atopy patch test and clinical expression of the disease in children with atopic eczema/dermatitis syndrome and respiratory symptoms. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;101(2):174-8
224. Eichenfield LF, Hanifin MJ, Beck AL et al. Atopic Dermatitis and Asthma: Pararelas in the Evolution in the Treatment. *Pediatrics* 2003;111:608-16
225. Lawrence F, Eichenfield JM, Hanifin LA et al. Consensus Conference on pедиатris atopic dermatitis. *J Am Academ Dermatol* 2003;49(6):1088-95
226. Holm L, Matuseviciene G, Scheynius A, Tengvall Linder M. Atopy patch test with house dust mite allergen – an IgE-mediated reaction? *Allergy* 2004;59:874-82
227. Ingordo V, D'Andria C, Tortora A. Results of atopy patch tests with house dust mites in adults with „intrinsic“ and „extrinsic“ atopic dermatitis. *J Europ Academ Dermatol Venereol* 2002;16(5):450-4
228. Manzini BM, Motilese A, Donini M, Seiwinari S. Contact allergy to *Dermatophagoides* in atopic dermatitis patients and healthy subjects. *Contact Dermatitis* 1995;33(4):243-6
229. Darsow U, Laifaoui J, Kerschenlohr K et al. The prevalence of positive reactions in the atopy patch test with aeroallergens and food allergens in subjects with atopic eczema; a European multicenter study. *Allergy* 2004;59(12):1318-25

230. Samochocki Z, Owzarek W, Zabielski S. Atopy patch test as an additional criterion. *Advan Dermatol Allergol* 2004;4:200-4
231. Ito A, Mukai H, Nishioka S. Histopathological findings of patch test with *Dermatophagoides* antigens in atopic dermatitis of the adult types. *Jpn J Dermatol* 1990;100:63-9 (in Japanese)
232. Langeveld-Wildschut EG, van Marion AMW, Thepen T, Mudde GC, Bruijnzeel PLB, Bruijnzeel-Koomen CAFM. Evaluation of variables influencing the outcome of the atopy patch test. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:66-73
225. Kato Y, Okubo Y, Koga M. Evaluation of patch testing in atopic dermatitis using commercially available environmental antigens. *Allergol Internat* 2001;50:153-62
234. Devos SA, Van Der Valk PGM. Epicutaneous patch testing. *Eur J Dermatol* 2002;12:506-14
235. Shah D, Hales J, Cooper D, Camp R. Recognition of pathogenically relevant house dust mite hypersensitivity in adults with atopic dermatitis: a new approach? *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:1012-8
236. Weissenbacher S, Bacon T, Targett D, Behrendt H, Ring J, Darsow U. Atopy Patch test – Reproducibility and Elicitation of Itch in Different Application Sites. *Acta Derm Venereol* 2005;85:147-51
237. Reitamo S, Visa K, Kahonen K, Kayuko K, Stubb S, Salo PO. Eczematous reactions in atopic patients caused by epicutaneous testing with inhalant allergens. *Brit J Dermatol* 1986;114:303-9
238. Langeland T, Braathen LB, Borch M. Studies of atopy patch tests. *Acta Derm Venereol (Stockh) Suppl* 1989;144:105-9
239. Darsow U, Vieluf D, Ring J. Evaluating the relevance of aeroallergen sensitization

- in atopic eczema with atopy patch test: a randomized, double-blind multicenter study. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:187-93
240. Van Woorst Vader PC, Lier JG, Woest TE, Coenraads PJ, Nater JP. Patch tests with house dust mite antigens in atopic dermatitis patients: methodological problems. *Acta Derm Venereol* 1991;71(4):301-5
241. Darsow U, Ring J: Airborne and dietary allergens in atopic eczema: a comprehensive review of diagnostic tests. *Clin Exp Dermatol* 2000;45:49-52
242. Goon A, Leow HY, Chan SK, NG, Goh CL. Atopy patch testing with aeroallergens in patients with atopic dermatitis and controls in Singapore. *Clin Exp Dermatol* 2005;30(6):627-31
243. Darsow U, Laifaoui J, Bolhaar S et al. The prevalence of positive reactions in the atopy patch test with aeroallergens and food allergens in subjects with atopic eczema: a multicenter study. *Allergy* 2004;59:1318-25
244. O'Brien M. Skin prick testing and *in vitro* assays for allergic sensitivity. *Aust Prescr* 2002;25:91-3
245. Reberdão M, Delgado L, Pinto H, Remédios A, Taborda-Barata L. Specific immunotherapy effect on peripheral blood T1/T2 lymphocytes in atopic patients. *Rev Port Pneumol* 2006;12:107-30
246. Chang, Lin Xp, Hao CL et al. Effect of 1-year specific immunotherapy with standardized house dust mite vaccine on mild and moderate allergic asthmatic patients. *Chin J Tuberc Respir Dis (Chin)* 2006;29:679-87
247. Joshi S. Allergen Immunotherapy for Allergic Diseases. *North Florida Med* 2008;59(2):41-3)
248. Schmidt-Weber CB, Blaser K. Immunological mechanisms in specific immunotherapy. *Springer Semin Immun* 2004;25:377-90

249. O'Brien RM. Immunotherapy for allergic disorders. *Aust Prescr* 2003;26(4):91-3
250. Mastrandrea F. Immunotherapy in atopic dermatitis. *Exp Opin Invest Drugs* 2001;10:49-63
251. Silny W, Czarnecka-Operacz M, Silny P. Efficacy of specific immunotherapy in the treatment of children and youngsters suffering from atopic dermatitis. Part I. Evaluation of clinical score. *Wiad Lekarskie* 2005;58:47-55
252. Czarnecka-Operacz, Silny W. Specific Immunotherapy in Atopic Dermatitis. *Acta Dermatovenerol Croat* 2006;14(1):52-9
253. Terracciano L, Calcinai E, Avitabile S, Galli E. Age and indications to SLIT. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009;22(4):5-8
254. Novak N. Allergen specific immunotherapy for atopic dermatitis. *Curr Op Allergy Clin Immunol* 2007;7(6):542-56
255. Mudde GC, Van Reijssen FC, Boland G, de Gast GC, Bruijnzeel PL, Bruijnzeel Koomen CA. Allergen presentation by epidermal Langerhans' cells from patients with atopic dermatitis is mediated by IgE. *Immunology* 1990;69:335-41
256. Galli E, Gianni S, Giovanni A, Ercole B, Giorgio M, Rossi P. Atopic dermatitis and asthma. *Allergy Asthma Proceed* 2007;28(5):540-3
257. Curtiss FR. Atopic March to a Dead End or Does the Theory Really Have Legs? *J Manag Care Pharm* 2007;13(9):810-1
258. Lowe AJ, Carlin BJ, Bennett M et al. Do boys do the atopic march while girls dawdle? *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1190-5

## 10.0. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 22.11.1954. g. u Banjaluci (BiH), gdje sam završio osnovnu i srednju medicinsku školu. Završio sam Medicinski fakultet u Beogradu 1979.g.

U Sarajevu sam položio stručni ispit 1982.g. a specijalistički ispit iz dermatovenerologije 1986.g. Magistarski rad iz područja alergologije i kliničke imunologije, pod naslovom: „Serumske koncentracije imunoglobulina u toku kontaktnog alergijskog dermatitisa“, obranio sam u Zagrebu 1990.g. (mentor prof dr sc V. Silobrčić).

Tijekom 1985-1992.g. asistent sam na Medicinskom fakultetu u Banjaluci na Katedri za dermatovenerologiju.

Od 1993-1996. g. uključen sam u Domovinski rat, a od 1996.g. zaposlen u Službi za kožne i spolne bolesti, OB Karlovac, na mjestu specijalista dermatovenerologa. Naziv primarijus priznat mi je 2009. god. Autor sam ili koautor u više stručnih i znanstvenih radova s recenzijom i sažetaka radova u indeksiranim i neindeksiranim časopisima.