Procjena alergijskoga potencijala voća i povrća u funkciji proizvodnih procesa

Marić, Mirela

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:796277

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Mirela Marić

PROCJENA ALERGIJSKOGA POTENCIJALA VOĆA I POVRĆA U FUNKCIJI PROIZVODNIH PROCESA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Mirela Marić

ASSESMENT OF THE ALLERGENIC POTENTIAL OF FRUIT AND VEGETABLES IN FUNCTION OF PRODUCTION PROCESSES

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2019.

Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Mirela Marić

PROCJENA ALERGIJSKOGA POTENCIJALA VOĆA I POVRĆA U FUNKCIJI PROIZVODNIH PROCESA

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Prof. dr. sc. Suzana Rimac Brnčić

Izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček

Zagreb, 2019.

University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Mirela Marić

ASSESMENT OF THE ALLERGENIC POTENTIAL OF FRUIT AND VEGETABLES IN FUNCTION OF PRODUCTION PROCESSES

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Suzana Rimac Brnčić, Ph. D., Full professor

Gordana Maravić Vlahoviček, Ph. D., Associate professor

Zagreb, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam
UDK: 57.083.32:582.693.21:582.795.24:582.930.13(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

PROCJENA ALERGIJSKOGA POTENCIJALA VOĆA I POVRĆA U FUNKCIJI PROIZVODNIH PROCESA

Mirela Marić, mag. nutr.

Rad je izrađen na Prehrambeno – biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Mentori: Prof. dr. sc. Suzana Rimac Brnčić
Izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček

Kratki sadržaj disertacije:

Voće i povrće podvrgavaju se velikom broju procesa pripreme kako bi se poboljšala njihova probavljivost, senzorska svojstva i produljila njihova trajnost. Toplinska i ultrazvučna obrada često se koriste pri proizvodnji različitih proizvoda na bazi voća i povrća koji mogu sadržavati alergene proteine. Stoga je važno istražiti učinak ovih tehnologija na njihovu alergenost kako bi se osigurali načini upravljanja rizicima od alergija tijekom proizvodnje i istražile nove tehnologije s ciljem smanjenja alergijskog potencijala konačnog proizvoda. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ultrazvučne i toplinske obrade na *in vitro* imunoreaktivnost proteinskih ekstrakata voća i povrća (jabuka, patlidžan, komorač). Na temelju arhiviranih FABER testova 111 ispitanika, načinjena je opsežna statistička analiza te su odabrani serumi triju pacijenata s visokom razinom specifičnih imunoglobulina E za alergene jabuke, patlidžana i komorača. Nakon ultrazvučnog i toplinskog tretmana, proteinski ekstrakti jabuke, patlidžana i komorača analizirani su SDS-poliakrilamidonom gel elektroforezom te imunokemijskim metodama Western-blot i ELISA. Rezultati istraživanja su pokazali da obrada ultrazvukom i povišenom temperaturom mijenjaju svojstva i alergenost proteina komorača, patlidžana i jabuke. Zbog križne reaktivnosti s antigenima iz breskve, obrada komorača ultrazvukom ili povišenom temperaturom mogla bi spriječiti dodatnu alergijsku reakciju kod ljudi alergičnih na breskvu. Da bi se stekao detaljniji uvid u učinke različitih procesa obrade i raznolikost pojedinačnih alergijskih odgovora, potrebno je analizirati veći broj ispitanika. Dobiveni rezultati ovog istraživanja povećavaju razumijevanje utjecaja konvencionalnih, ali i novih procesa obrade na alergene voća i povrća.

Broj stranica: 132
Broj slika: 29
Broj tablica: 47
Broj literaturnih navoda: 175
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: alergeni, IgE, FABER test, Western blot, SDS- PAGE, ELISA, komorač, patlidžan, jabuka
Datum obrane: 13.11.2019.
Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Dr. sc. Damir Ježek, redoviti profesor (Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet)
2. Dr. sc. Jasenka Gajdoš – Kljusurić, redovita profesorica (Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet)
3. Dr. sc. Renata Jurišić Grubešić, redovita profesorica (Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4, te u Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **Ph. D. thesis**
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Postgraduate study Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition
UDK: 57.083.32:582.693.21:582.795.24:582.930.13(043.3)
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

ASSESSMENT OF THE ALLERGENIC POTENTIAL OF FRUIT AND VEGETABLES IN FUNCTION OF PRODUCTION PROCESSES

Mirela Marić, M. Sc. Nutrition

Thesis perfomed at University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology and University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Supervisors: Suzana Rimac Brnčić, Ph. D., Full professor
Gordana Maravić Vlahoviček, Ph. D., Associate professor

Short abstract:

Fruits and vegetables are subjected to a number of preparation processes to improve their digestibility, sensory properties and extend their shelf-life. Thermal and ultrasonic treatments are often used in the production of various fruit and vegetable based products that may contain allergenic proteins. Therefore, it is important to investigate the impact of these technologies on their allergenicity in order to provide ways of managing allergy risks during production and to explore new technologies aimed at reducing the allergic potential of the final product. The aim of this study was to investigate the effect of ultrasound and heat treatment on the *in vitro* immunoreactivity of protein extracts of fruits and vegetables (apple, eggplant, fennel). Based on the extensive statistical analysis of the archived FABER assays of 111 individuals, sera of three patients with high levels of specific immunoglobulin E for allergenic apples, eggplants and fennel were selected for further studies. After ultrasonic and thermal treatment, protein extracts were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunochemical methods Western blot and ELISA. The results of the study showed that ultrasonic and thermal treatment altered the properties and allergenicity of fennel, eggplant and apple proteins. Due to the cross-reactivity with peach antigens, fennel treatment by ultrasound or heat could prevent additional allergic reactions in people allergic to peach. In order to gain more insight into the effects of different treatments and the variety of individual allergic responses, a larger number of subjects need to be analyzed. The results of this study increase the understanding of the impact of conventional as well as novel processing methods on fruit and vegetable allergens.

Number of pages: 132
Number of figures: 29
Number of tables: 47
Number of references: 175
Original in: croatian
Key words: allergens, IgE, FABER test, Western blot, SDS-PAGE, ELISA, eggplant, fennel, apple

Date of the thesis defense: 13.11.2019
Reviewers:

1. Damir Ježek, Ph. D., Full professor (University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology)
2. Jasenka Gajdoš – Kljusurić, Ph. D., Full professor (University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology)
3. Renata Jurišić Grubešić, Ph. D., Full professor (University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry)

Thesis deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology in Zagreb, Kačićeva 23 and National and University Library in Zagreb, Hrvatske bratske zajednice 4, and in University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

Tema doktorskog rada prihvaćena je na 3. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za akademsku godinu 2011/2012 na sjednici održanoj 13. prosinca 2011. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o pokretanju postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na sjednici održanoj 16. listopada 2012.

ŽIVOTOPIS MENTORA DOKTORSKOG RADA

Prof.dr.sc. Suzana Rimac Brnčić, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Suzana Rimac Brnčić diplomirala je na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1995. godine. Od 1995-1997 radi kao viši tehnički suradnik u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 1997. godine je znanstvena novakinja. Magistarski rad obranila je je 29.ožujka 2001.g. Doktorski rad obranila je 06.listopada 2006. godine. U zvanje redovite profesorice izabrana je 2017. Godine. Trenutno je pročelnica Kabineta za procese pripreme hrane.Prof. dr.sc. Suzana Rimac Brnčić, do sada je sudjelovala u izvedbi nastave (vježbe, seminari, predavanja) na kolegijima Procesi pripreme hrane, Fizikalna svojstva složenih sustava-hrane, Prehrambeno-procesno inženjerstvo 1, Prehrambeno-procesno inženjerstvo 2, Procesi konzerviranja prehrambenih proizvoda i Nova hrana. U razdoblju od 2007-2011. godine dr.sc. Suzana Rimac Brnčić, bila je članica Odbora za osiguranje i praćenje kvalitete nastave, od 2011-2015. godine članica je Povjerenstva za studentske radove, a od 2015. godine je predsjednica Odbora za diplomske i završne radove. Kao suradnica sudjelovala je u realizaciji više nacionalnih znanstveno-istraživačkih projekata (Razvoj prehrambenih proizvoda više biološke vrijednosti; Razvoj novih funkcionalnih proizvoda i njihova stabilnost; Nove tehnike procesiranja u proizvodnji funkcionalne hrane; Održivi razvoj inovacije u hrani-valorizacija otpada masline), a od 2012. godine i međunarodnih projekata (Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process; The Network for the Biology of Zinc; Interindividual variation in response to consumption of plant food bioactives and determinants involved; Risk Assessment of mixture of contaminants present in food). Rezultati znanstveno-istraživačkog rada prof. dr. sc. Suzane Rimac Brnčić objavljeni su u stranim i domaćim znanstvenim časopisima te zbornicima radova s međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova. Objavila je ukupno 47 znanstvenih radova, od kojih je 26 znanstvenih radova klasificirano u a1 skupini, jedanaest radova je klasificirano u a2 skupini te deset radova iz skupine a3. Objavljeni znanstveni radovi citirani su ukupno 702 puta, h- indeks 15 (ISI Web of Science). Njen znanstveno-istraživački rad obuhvaća prehrambeno inženjerstvo, a područje njezina rada je usmjereno na ispitivanja vezana uz nove tehnike procesiranja u proizvodnji funkcionalne hrane, primjenu novih tehnika obrade i pripreme različitih prehrambenih sirovina (koncentrati i izolati proteina sirutke, škrobovi, pektini) te njihov utjecaj na fizikalno - kemijske i funkcionalne značajke tih materijala (topljivost, emulgiranje, pjenjenje, raspodjela veličina čestica, boja, stupanj kristaliničnosti, tekstura, in vitro probavljivost). Također je ispitivala utjecaj novijih procesa obrade (tribomehanička mikronizacija, ultrazvuk, visoki tlakovi, enzimska hidroliza) i dodatka različitih hidrokoloida na poboljšanje reoloških i termofizičkih svojstava proteina sirutke te se bavila određivanjem teksturalnih svojstava ekstrudiranih proizvoda obogaćenih proteinima sirutke. U zadnje vrijeme područje njenog znanstvenog rada obuhvaća i valorizaciju otpada masline te rajčice. Rezultate svojih istraživanja prezentirala je na 45 međunarodnih i sedam domaćih znanstvenih skupova. Pod njenim mentorstvom izrađena je jedna disertacija, 16 diplomskih i 15 završnih radova te studentski istraživački rad nagrađen Dekanovom nagradom. Angažirana je kao recenzent znanstvenih radova u međunarodnim časopisima i zbornicima radova. Sudjelovala je kao plenarni i pozvani predavač na međunarodnim znanstvenim skupovima. Članica je uređivačih odbora više znanstveno-stručnih časopisa. Bila je članica znanstvenih i organizacijskih odbora međunarodnih i nacionalnih znanstvenih skupova. Dobitnica je Državne nagradu za znanost za znanstvene novake 2001. godine. Iste godine dodijeljena joj je i potpora Biotehničke zaklade PBF-a.

ŽIVOTOPIS MENTORA DOKTORSKOG RADA

Izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček, Farmaceutsko – biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Gordana Maravić Vlahoviček rođena je 17. rujna 1973. u Zagrebu gdje je završila osnovnu školu, gimnaziju i osnovnu glazbenu školu. Diplomirala je 1996. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (studij Molekularne biologije) kao prva u generaciji, uz dvogodišnju stipendiju grada Zagreba za 50 najboljih studenata.
Od 1997. zaposlena je u Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Magistarski rad (poslijediplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu) obranila je 2000., a akademski stupanj doktora prirodnih znanosti, područje biologija, stekla je 2002. U znanstveno-nastavno zvanje docentice u području biologije izabrana je 2004. godine, a u znanstveno-nastavno zvanje izvanredne profesorice u području biologije 2014. godine.
Voditeljica je i/ili sudjeluje u izvođenju svih oblika nastave iz dodiplomskih kolegija Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom, Biološka kemija i Individualizirana briga za zdravlje, poslijediplomskih kolegija Biotehnologija u farmaciji i Bioinformatika te kolegija Biološki terapeutici i Biotehnološki lijekovi biljnog podrijetla na poslijediplomskim specijalističkim studijima Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
U koautorstvu je objavila 10 nastavnih tekstova i bila prevoditeljica dijela sveučilišnog udžbenika. Pod njenim voditeljstvom izrađene su dvije disertacije, dvije disertacije su u postupku, 7 poslijediplomskih specijalističkih radova, tridesetak diplomskih radova, tri studentska istraživačka rada nagrađenih Rektorovom nagradom i dva studentska istraživačka rada nagrađena Dekanovom nagradom.
Znanstveno se usavršavala na International Centre for Genetic Engineering and Bioctechnology u Trstu, Italija u razdoblju od 2000.-2002. te na nekoliko naprednih tečajeva i škola.
Kao suradnica sudjelovala je u realizaciji 14 domaćih i međunarodnih znanstveno-istraživačkih projekata te je bila voditeljica projekta MZOŠ, dvaju međunarodnih projekata ICGEB, jedna od 3 glavna istraživača na međunarodnom projektu FP6 i jedna od 5 glavnih istraživača na FP7-RegPot projektu Integra-Life. Rezultate svojih znanstvenih istraživanja usmjerenih na mehanizme bakterijske rezistencije na ribosomske antibiotike, mehanizme djelovanja rRNA metil-transferaza i mehanizme bakterijske stanične komunikacije objavila je u 18 znanstvenih (*h*-indeks 11) i 5 stručnih radova. Održala je 19 pozvanih predavanja i prezentirala šezdesetak posterskih priopćenja na međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima te održala 9 javnih predavanja. 2003. godine nagrađena je godišnjom nagradom Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju za mlade znanstvenike. Bila je članica i predsjednica znanstvenih i/ili organizacijskih odbora nekoliko domaćih i međunarodnih kongresa, tečajeva i neprednih škola. Članica je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, Hrvatskog mikrobiološkog društva i Hrvatskog biološkog društva. Od 2009. je potpredsjednica Odbora za ograničenu uporabu genetički modificiranih organizama pri Ministarstvu zdravstva Republike Hrvatske. Od 2006. – 2012. bila je članica Nastavnog povjerenstva, od 2012. -2014. predsjednica Povjerenstva za studentske radove i nagrade, a od 2007. – 2012. obnašala je dužnost predstojnice Zavoda za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

ZAHVALE

Zahvaljujem svojim mentoricama, posebno prof. dr.sc. Suzani Rimac Brnčić i izv. prof. dr. sc. Gordani Maravić Vlahoviček te doc. dr. sc. Mariji Badanjak Sabolović na vođenju, usmjeravanju, praćenju, savjetima i cijeloj pomoći tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Zahvaljujem ravnateljima Poliklinike Aviva mr.sc. Damir Jurinović, dr.med., Igor Đurić, dipl.ing.el. i Slaven Janečić, MBA te Poliklinike Analiza Marinu Bosotini mag.pharm. na financijskoj i stručnoj pomoći tijekom studija i rada na doktorskom radu.

Zahvaljujem se Institute of Biosciences and BioResources (IBBR), National Reserch Council u Italiji i Maria Antonietta Ciardiello, PhD na stručnoj pomoći oko svih potrebnih alergena i savjeta u radu sa alergenima .

Zahvaljujem kolegama iz Poliklinike Aviva, svom Nutrilife Centru i svojim dragim prijateljima na razumijevanju i podršci.

Zahvaljujem mojim najdražima, svojoj obitelji; djeci Domagoju i Viktoriji, suprugu Damiru i roditeljima, mami Ani i tati Antunu, na nesebičnoj pomoći, razumijevanju, podršci, strpljenju i ljubavi kroz sve ove godine mog aktivnog učenja i edukacija.

SAŽETAK

Voće i povrće podvrgavaju se velikom broju postupaka pripreme kako bi se poboljšala njihova probavljivost, senzorska svojstva i produljila njihova trajnost. Toplinska i ultrazvučna obrada često se koriste pri proizvodnji različitih proizvoda na bazi voća i povrća koji mogu sadržavati alergene proteine. Stoga je važno istražiti učinak ovih tehnologija na njihovu alergenost kako bi se osigurali načini upravljanja rizicima od alergija tijekom proizvodnje i istražile nove tehnologije s ciljem smanjenja alergijskog potencijala konačnog proizvoda. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ultrazvučne i toplinske obrade na *in vitro* imunoreaktivnost proteinskih ekstrakata voća i povrća (jabuka, patlidžan, komorač). Na temelju arhiviranih FABER testova 111 ispitanika, načinjena je opsežna statistička analiza te su odabrani serumi triju pacijenata s visokom razinom specifičnih imunoglobulina E za alergene jabuke, patlidžana i komorača. Nakon ultrazvučnog i toplinskog tretmana, proteinski ekstrakti jabuke, patlidžana i komorača analizirani su SDS-poliakrilamidonom gel elektroforezom te imunokemijskim metodama Western-blot i ELISA. Rezultati istraživanja su pokazali da obrada ultrazvukom i povišenom temperaturom mijenjaju svojstva i alergenost proteina komorača, patlidžana i jabuke. Zbog križne reaktivnosti s antigenima iz breskve, obrada komorača ultrazvukom ili povišenom temperaturom mogla bi spriječiti dodatnu alergijsku reakciju kod ljudi alergičnih na breskvu. Da bi se stekao detaljniji uvid u učinke različitih postupaka obrade i raznolikost pojedinačnih alergijskih odgovora, potrebno je analizirati veći broj ispitanika. Dobiveni rezultati ovog istraživanja povećavaju razumijevanje utjecaja konvencionalnih, ali i novih postupaka obrade na alergene voća i povrća.

ABSTRACT

Fruits and vegetables are subjected to a number of preparation processes to improve their digestibility, sensory properties and extend their shelf-life. Thermal and ultrasonic treatments are often used in the production of various fruit and vegetable based products that may contain allergenic proteins. Therefore, it is important to investigate the impact of these technologies on their allergenicity in order to provide ways of managing allergy risks during production and to explore new technologies aimed at reducing the allergic potential of the final product. The aim of this study was to investigate the effect of ultrasound and heat treatment on the *in vitro* immunoreactivity of protein extracts of fruits and vegetables (apple, eggplant, fennel). Based on the extensive statistical analysis of the archived FABER assays of 111 individuals, sera of three patients with high levels of specific immunoglobulin E for allergenic apples, eggplants and fennel were selected for further studies. After ultrasonic and thermal treatment, protein extracts were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunochemical methods Western blot and ELISA. The results of the study showed that ultrasonic and thermal treatment altered the properties and allergenicity of fennel, eggplant and apple proteins. Due to the cross-reactivity with peach antigens, fennel treatment by ultrasound or heat could prevent additional allergic reactions in people allergic to peach. In order to gain more insight into the effects of different treatments and the variety of individual allergic responses, a larger number of subjects need to be analyzed. The results of this study increase the understanding of the impact of conventional as well as novel processing methods on fruit and vegetable allergens.

ŽIVOTOPIS

Mirela Marić rođena je 13. kolovoza 1976. u Slavonskom Brodu, gdje završava osnovnu školu i Opću gimnaziju. Diplomirala je 2000. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu studij Prehrambene tehnologije, smjer Nutricionizam. Nakon završetka studija radi u službama prodaje, kao voditelj marketinga i na području nutricionizma. Od 2004. zaposlena je u Poliklinici Aviva i radi kao Voditeljica Centra za regulaciju tjelesne težine. Suvlasnica je nutricionističko – dijagnostičkog Nutrilife Centra . Uz suvremenu medicinsko - biokemijsku dijagnostiku, stručan tim nutricionista i u suradnji sa liječnicima, psiholozima i kineziolozima radi kompletna nutricionistička rješenja za sve dijetoterapije i preventivna ulaganja u zdravlje. Svojim multidisciplinarnim pristupom radi sa svim dobnim skupinama - djecom i odraslima prilagođenih svim dnevnim i fizičkim aktivnostima, sportašima (rekreativcima i profesionalcima), te osobama sa raznim liječničkim dijagnozama. Unutar nutricionističke ambulante radi cjelovitu analizu sastava tjelesne mase, određivanja vitaminsko-mineralnog statusa i suplementaciju (nadopuna prehrane), izrađuje individualne programe prehrane te aktivno sudjeluje u svim marketinškim aktivnostima (TV emisije, radijske emisije, pisanje članaka u svim dnevnim novinama i časopisima, specijaliziranim medicinskim časopisima, edukacije i predavanja, savjetovanja, panel diskusije i kolumne). Aktivno surađuje sa svim nadležnim zdravstvenim institucijama, prati zakonodavstva i pravilnike o prehrani i dijetetici. Redovito sudjeluje na znanstvenim usavršavanjima – Summer school „Healthy lifestyle and prevention of stroke“ (2013) Dubrovnik i Training school „Food Digestion and Human Health„ (2014) u Budimpešti, sudjeluje na tečajevima trajne edukacije, te predaje na brojnim znanstveno – stručnim domaćim i međunarodnim kongresima i konferencijama.

Do sada je objavila 2 znanstvena rada:

Marić, M., Ninčević Grassino, A., Zhu, Z., Barba, J. F., Brnčić, M., Rimac Brnčić, S. (2018) An overview of traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by- products: ultrasound, microwaves and enzyme - assisted extraction. *Trends in Food Science & Technology*. **76**, 28-37

Butorac, A., Marić, M., Badanjak Sabolović, M., Hruškar, M., Rimac Brnčić, S., Bačun Družina, V. (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. *Croatian Journal of Food Techology, Biotechnology and Nutrition*. **8** (3-4), 90-101

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, **Mirela Marić**, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugima izvorima do onih navedenih u radu.

_____

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. OPĆI DIO 2

2.1. Klasifikacija neželjenih reakcija na hranu 2

2.2. Alergijske reakcije na hranu 3

2.3. Patogeneza razvoja alergijskih reakcija 5

2.4. Dijagnoza alergije na hranu 8

2.4.1. Provokacijski testovi na hranu 9

2.4.2. Određivanje razine ukupnog i specifičnog imunoglobulina E u uzorku seruma 9

2.4.3. Kožni ubodni test 10

2.5. Različiti pristupi suzbijanju alergija na hranu 10

2.6. Epidemiologija alergije na hranu 11

2.7. Alergeni u hrani 16

2.7.1. Alergeni biljnog podrijetla 17

2.7.2. Alergeni životinjskog podrijetla 26

2.8. Križne reakcije 26

2.9. Stabilnost alergena iz hrane 27

2.10. Utjecaj obrade hrane na alergenost 28

2.10.1. Konvencionalni postupci obrade hrane 31

2.10.1.1. Toplinski postupci 31

2.10.1.2. Netoplinski postupci 35

2.10.2. Novi postupci obrade 36

2.10.2.1. Toplinski postupci 36

2.10.2.2. Netoplinski postupci 37

3. MATERIJALI I METODE 41

3.1. Materijali 41

3.1.1. Standardne kemikalije 41

3.1.2. Boje 41

3.1.3. Protutijela i drugi proteini 42

3.1.4. Gelovi za elektroforezu i membrane za imunodetekciju 42

3.1.5. Specifične komercijalne smjese analitičkih reagencija- kompleti 42

3.1.6. Serumi ispitanika 42

4. METODE RADA 43
4.1. Laboratorijsko - dijagnostički test – FABER test 43
4.2. Obrada rezultata dijagnostičkih testova 44
4.2.1. Statistička analiza 44
4.2.2. Računanje momenata statističkih skupova 45
4.3. Priprema ekstrakata voća i povrća 46
4.4. Obrada proteinskih ekstrakata 47
4.5. SDS-poliakrilamidna gel-elektroforeza (SDS-PAGE) 48
4.6. Određivanje molekulske mase proteina pomoću SDS-PAGE 48
4.7. Western-blot 49
4.8. ELISA 51
5. REZULTATI 53
5.1. Distribucija ispitanika 54
5.1.1. Utvrđivanje značajnosti 82
5.1.2. Multivarijatna analiza 92
5.2. Elektroforetska analiza proteinskih ekstrakata 95
5.3. Imunokemijska detekcija alergena Western blotom 97
5.4. Imunokemijska detekcija alergenih proteina metodom ELISA 98
6. RASPRAVA 102
6.1. Distribucija ispitanika 102
6.1.1. Utvrđivanje značajnosti 106
6.1.2. Multivarijatna analiza 108
6.2. Elektroforetska analiza proteinskih ekstrakata 109
6.3. Imunokemijska detekcija alergena Western blotom 110
6.4. Imunokemijska detekcija alergenih proteina metodom ELISA 111
7. ZAKLJUČCI 114
8. LITERATURA 115

1. UVOD

Alergijske bolesti su postale globalni problem. Prema statistikama Svjetske zdravstvene organizacije, WHO (engl. World Health Organisation), 30-40 % ukupnog svjetskog stanovništva boluje od barem jedne alergijske bolesti. U prošlosti su alergijske bolesti tretirane kao rijetke. U novije doba postajemo svjedoci velikog povećanja njihove učestalosti. Europska akademija za alergiju i kliničku imunologiju (EAACI) iznijela je podatak kako više od 150 milijuna Europljana pati od kroničnih alergija, a trenutna prognoza je da će do 2025. godine biti pogođena polovica ukupne populacije Europske unije. Alergijska reakcija na hranu imunosna je reakcija organizma na pojedini sastojak hrane unutar koje su proteini glavne alergene komponente u hrani.

Alergena aktivnost namirnice može se smanjiti, ostati ista ili čak povećati postupkom prerade hrane. S obzirom na brojne strukture alergena sadržanih u cjelovitoj namirnici, te imajući u vidu da isti postupak obrade može imati različito djelovanje na različite proteine, utjecaj obrade hrane na strukturna i alergena svojstva alergenih namirnica teško je predvidjeti. Nadalje, stupanj modifikacije alergenih proteina prilikom obrade hrane ovisi o vrsti postupka i uvjetima, strukturi proteina i sastavu matriksa hrane.

Uzimajući u obzir da se toplinska i ultrazvučna obrada često koriste pri proizvodnji različitih proizvoda na bazi voća i povrća, a koji mogu sadržavati alergene proteine, važno je istražiti učinak ovih tehnologija na njihovu alergenost kako bi se osigurali načini upravljanja rizicima od alergija tijekom proizvodnje.

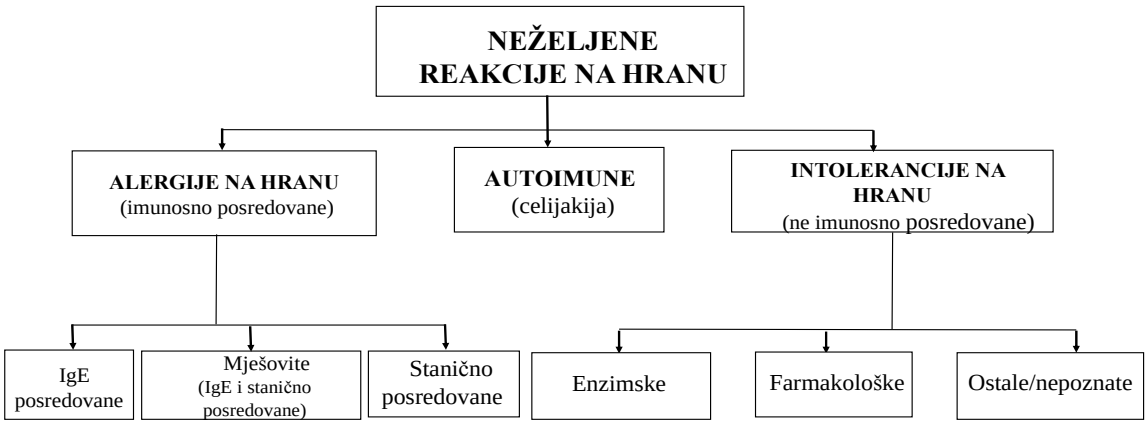
S ciljem određivanja alergijskog potencijala, na temelju statističke obrade dijagnostičkih testova, od ukupnog broja pacijenata odabrani su serumi osoba na osnovu rezultata mjerenja specifičnog IgE-a za različite vrste voća i povrća, a čija je razina senzibilizacije visoka. S obzirom na rezultate presjeka dobi i spola, kao voće i povrće koje učestalo izaziva alergijske reakcije istraživani su proteinski ekstrakti jabuke, komorača i patlidžana.

Glavni cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj ultrazvučne i toplinske obrade na njihovu *in vitro* imunoreaktivnost, uz analizu elektroforetskim i imunokemijskim metodama.

2. OPĆI DIO

2.1. Klasifikacija neželjenih reakcija na hranu

Neželjene reakcije na hranu klasificiraju se u različite skupine na osnovu patogenih mehanizama (Slika 1) (European Food Safety Authority, EFSA, 2014). U neželjene reakcije na hranu ubrajaju se imunosne reakcije izazvane IgE protutijelima, stanično (ne-IgE) izazvane, kombinirane ili neimunosne reakcije na hranu (intolerancija na hranu) koje ovise o nedostatku enzima ili farmakološkim reakcijama, ili se, pak, u većini slučajeva javljaju uslijed nepoznatih mehanizama (Slika 1) (Waserman i Watson, 2011).



Slika 1. Klasifikacija neželjenih reakcija na hranu (EFSA, 2014)

Pojam alergen ograničen je na proteine i peptide odgovorne za alergijski potencijal hrane, imajući na umu da na alergenost hrane utječe i određeni udio ugljikohidrata. Imunogenost označava sposobnost izazivanja humoralnog ili staničnog imunosnog odgovora, dok je antigenost sposobnost specifičnog vezanja na krajnje produkte imunosnog odgovora, primjerice na protutijela. Prema zastupanom mišljenju, pojam alergenost (tj. mogućnost izazivanja alergije i/ili alergijske reakcije) ograničena je na mogućnost izazivanja alergijske reakcije i ne odnosi se na mogućnost izazivanja senzibilizacije.

Alergija na hranu definira se kao nepovoljni zdravstveni utjecaj uslijed specifične imunosne reakcije prouzrokovane opetovanim oralnim izlaganjem određenoj hrani putem IgE protutijela svojstvenih određenoj hrani, ili staničnih mehanizama, ili pak kombinirano. 30-40 % ukupnog svjetskog stanovništva boluje od barem jedne alergijske bolesti. Alergijske bolesti se razvijaju i mijenjaju tijekom života, a očituju se u obliku različitih simptoma koji se mogu javiti u bilo kojem organskom sustavu, u bilo kojem razdoblju života, a intenzitet im slabi starenjem.

Alergije na hranu posredovane imunoglobulinima E mogu rezultirati naglim i akutnim reakcijama (obično unutar 2 sata nakon oralnog izlaganja određenoj hrani), a mogu se očitovati uz mnoštvo raznovrsnih simptoma koji mogu zahvatiti probavni, dišni, kardiovaskularni i kožni sustav (Boyce i sur., 2011). Reakcije se kreću od blagih (npr. osip/koprivnjača) do akutnih (npr. anafilaksija). Imunosne IgE alergije na hranu češće pogađaju samo gastrointestinalni trakt na subakutni ili kroničan način. Do reakcije tipično dolazi s odgodom od 2 do 48 sati nakon konzumiranja određene hrane. Pod primarne poremećaje ove kategorije spadaju enterokolitis i proktitis izazvani proteinima iz hrane, te enteropatija, koji se u većini slučajeva riješe do perioda adolescencije. Enteropatija izazvana kravljim mlijekom jedna je od bolje objašnjenih ne-IgE alergija na hranu. Premda su eozinofilni gastrointestinalni poremećaji (poput eozinofilnog ezofagitisa i eozinofilne enteropatije) također tipično unutar navedene kategorije, velik broj slučajeva izazvan je IgE uvjetovanim reakcijama. Neimunosne neželjene reakcije na hranu (tzv. intolerancija na hranu) obuhvaćaju poremećaje poput intolerancije na laktozu (zbog nestanka enzima laktaze), te druge poremećaje probavno-apsorpcijskih procesa, toksične (trovanje hranom) i farmakološke reakcije (tzv. pseudoalergijske reakcije) uslijed otpuštanja histamina ili tiramina nakon konzumiranja određene hrane (Guandalini i Newland, 2011).

2.2. Alergijske reakcije na hranu

IgE alergijske reakcije na hranu karakterizira jasno definirana klinička slika. Alergijska reakcija podrazumijeva proces koji se sastoji od dvije faze. Najprije je potrebno utvrditi sposobnost odgovora alergijskom reakcijom nakon izlaganja određenom alergenu. To potiče imunosni sustav na proizvodnju specifičnih IgE protutijela za borbu protiv alergena. To je indukcijska faza tj. faza senzibilizacije. Nakon što je pojedinac senzibiliziran na određeni alergen, on može razviti simptome alergijske reakcije nakon ponovnog izlaganja dotičnom

alergenu. To se naziva fazom okidanja tj. provociranja. Imunosno nepovoljne reakcije na hranu očituju se kroz objektivna klinička obilježja i subjektivne simptome različite jačine i trajanja, koji utječu na različite organe i sustave (Tablica 1).

Tablica 1. Uobičajena klinička slika alergije na hranu (Dupont, 2011)

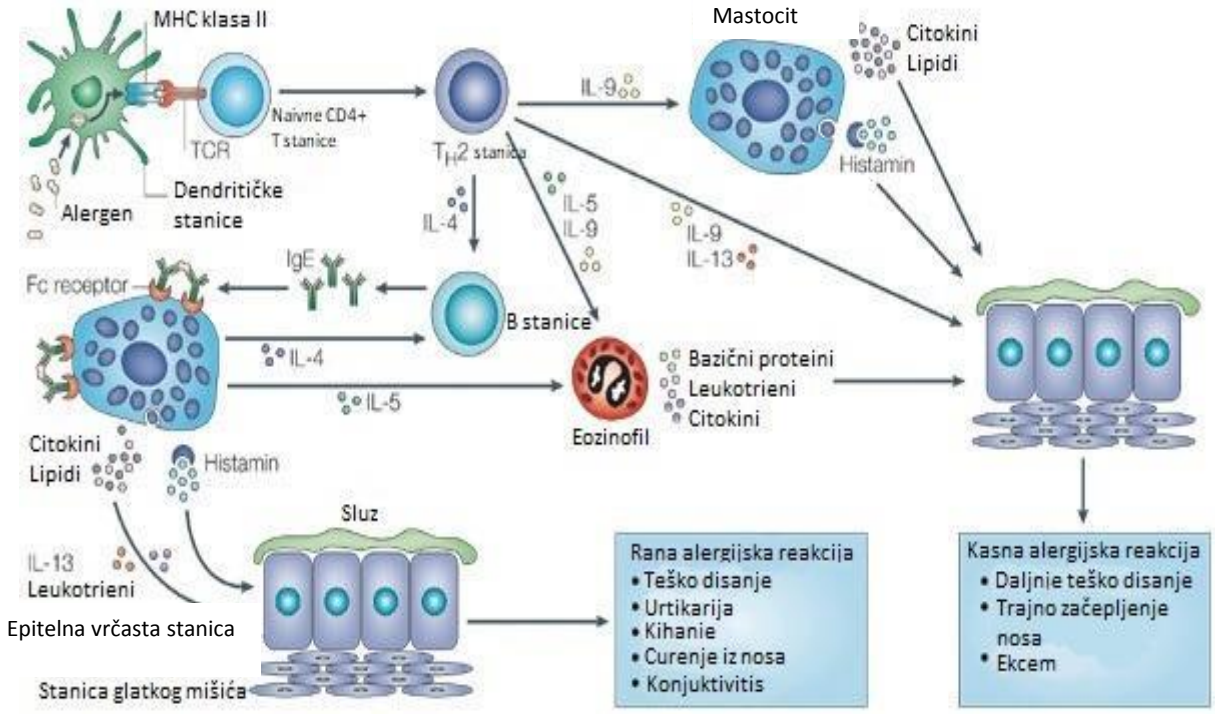
Sustav organa:	**Klinička slika:**	**Opaske:**
Koža	atopijski dermatitis	najučestalija kožna manifestacija
	svrbež	gotovo uvijek popratni simptom kožnih promjena
	angioedem	često nespecifična reakcija ako je izolirana kao simptom
	urtikarija	početak najčešće u ranom djetinjstvu, dominantan genetički faktor
	crvenilo	učestalije po tipu zakašnjele alergijske reakcije dugotrajnijeg tijeka
Dišni sustav	astma	klasičan simptom alergijske reakcije sa specifičnim IgE protutijelima
	rinitis	učestalije uz astmatske simptome
	kašalj	sezonska i perenijalna ovisno o uzročnim alergenima
Oči	konjuktivitis	uglavnom uz rinitis i češći kod polenoza
Općenito/sustavno	anafilaksija	moguća vitalna ugroženost cirkulatornim šokom i asfiksijom uslijed edema sluznice

Imunosno uvjetovane nepovoljne reakcije na hranu očituju se kroz klinička obilježja i simptome različite jačine i trajanja, te mogu zahvatiti različite organe i sustave. Anafilaktičke reakcije na hranu su IgE uzrokovane i do njih može doći u bilo kojoj životnoj dobi. Ne-IgE uzrokovana alergija na hranu uključuje širok spektar bolesti, uključujući i enterokolitis izazvan proteinom te eozinofilni ezofagitis.

2.3. Patogeneza razvoja alergijskih reakcija

Makrofagi MHC klase II tj. dendritičke stanice su prvi kontakt kod ulaza potencijalnog alergena u organizam. One ih prenose naivnim T limfocitima, a u slučaju razvoja alergijske reakcije, daljnji prijenos alergena ide kroz pojačanu produkciju Th 2 limfocita. U ovoj fazi presudna je dominacija produkcije Th2 limfocita u odnosu na Th1 limfocite. Daljnji razvoj alergijske reakcije odvija se u više pravaca (Slika 2).

Jedan od glavnih je kroz produkciju medijatora interleukina IL-4 koji stimuliraju produkciju B limfocita, a time i produkciju IgE i vezivanje njihovog fragmenta Fc na receptore na površini mastocita. Ovakvo vezivanje izaziva produkciju medijatora citokina odnosno leukotriena i histamina. Ovi medijatori svojim djelovanjem na epitelne stanice i stanice glatkog mišićnog tkiva izazivaju edeme i pojačanu sekreciju te spazam glatkih mišića, a time i kliničke simptome ranih alergijskih reakcija rinitisa, konjunktivitisa, astme i urtikarija.



Slika 2. Patogeneza razvoja alergijskih reakcija (preuzeto i prilagođeno iz Hawrylowicz i O'Garra, 2005)

Drugi pravac razvoja procesa alergijske reakcije od informiranih Th2 limfocita razvija se kroz proizvodnju medijatora interleukina IL-5 i IL-9 koji stimuliraju produkciju eozinofila, a te stanice izlučuju medijatore citokina, leukotriena i bazičnih proteina s efektom na epitelne stanice i glatke mišićne stanice i nastankom kasnih alergijskih reakcija uz kliničke manifestacije produljenih simptoma astme, produženog začepljenja nosa te kožne promjene u vidu ekcema. U isto vrijeme produkcija interleukina IL-9 stimulira i mastocite na produkciju medijatora histamina, citokina, lipida, a ovi medijatori također pojačavaju razvoj već navedenih zakašnjelih alergijskih reakcija i alergijskih simptoma.

Alergijske reakcije kože manifestiraju se kao svrbež, crvenilo i angioedem. Urtikarija prouzrokovana konzumiranjem hrane najčešće izbija nakon nekoliko sati te često nestaje unutar 3 sata. Atopijski dermatitis oblik je kronične bolesti upale kože praćene ekstremnim svrbežom, koja se obično javlja u ranom djetinjstvu i ponekad se proteže do odrasle dobi. Atopijski dermatitis predstavlja prvu kliničku alergijsku manifestaciju u djece kod koje se kasnije može razviti astma te alergijski rinitis. Pacijenti s atopijskim dermatitisom obično imaju povišen specifičan IgE, pozitivan kožni ubodni test (engl. skin prick test – SPT) na nekoliko alergena i genetičku predispoziciju. Dijagnoza atopijskog dermatitisa zasniva se na općeprihvaćenim internacionalnim kriterijima koji uzimaju u obzir različite kliničke i laboratorijske parametre, poput vrste i rasprostranjenosti manifestacije na koži, dobi, povezanost s drugim atopijskim bolestima, ukupan i specifičan IgE.

Nepovoljne reakcije koje pogađaju probavni sustav mogu se izraziti kao blaga oralna neugoda nakon izlaganja alergenu, ali i u obliku akutne dijareje. Bilo koji dio probavnog sustava može biti zahvaćen i obilježja kliničke slike mogu se javljati pojedinačno ili skupa kao dio sindroma. Dok je oralni alergijski sindrom posljedica IgE uvjetovanih imunosnih reakcija, ostali simptomi koji zahvaćaju probavni sustav većinom su mješovitog tipa. Oralni alergijski sindrom (OAS) predstavlja IgE uvjetovane momentalne alergijske reakcije kod kojih se simptomi javljaju unutar nekoliko minuta nakon kontakta s hranom, uključujući usta i ždrijelo (Ortolani i sur., 1988).

Direktan kontakt s određenom hranom može izazvati oralni i ždrijelni svrbež, oralne čireve, iritaciju usana te oticanje i edem glotisa. U nekim slučajevima navedeni simptomi mogu biti popraćeni složenijom kliničkom slikom. OAS se klasificira u 4 stupnja, ovisno o mjeri do koje su zahvaćeni drugi organi i o tome dolazi li do sustavne reakcije. Reakcije kod OAS-a rijetko mogu uznapredovati i proširiti se na ostale organe osim intestinalnih ili dovesti do anafilaksije (Webber i England, 2010). OAS je često povezan sa selektivno labilnim

alergenima koje sadrži svježe voće i povrće te stoga standardna dijagnostička procedura obavezno uključuje izlaganje svježem voću i povrću. Oralni su simptomi rjeđi u pacijenata s alergijama na hranu životinjskog podrijetla, poput mlijeka, jaja, ribe i škampa (Amlot i sur., 1987). Povraćanje je uobičajena pojava kod alergijskih reakcija na hranu (Hill i sur., 1984), a može doći i do učestale rijetke stolice zbog smanjene apsorpcije nutrijenata i vode, uslijed crijevne sekrecije tekućine zbog upale, ili iz oba navedena razloga kombinirano. Proteinom izazvan sindrom enterokolitisa akutna je sustavna reakcija na proteine iz hrane, do koje obično dolazi unutar 4 sata od konzumiranja hrane, primarno u dojenčadi, no, može se pojaviti i kod starije djece i odraslih (Nowak-Wegrzyn i Muraro, 2009). S druge strane, gotovo 10 % djece alergične na kravlje mlijeko pati od opstipacije (Kiefte-de Jong i sur., 2010).

U ranom djetinjstvu mogu se javiti i prolazne enteropatije na kravlje mlijeko, soju, jaja i sličnu hranu. Glavno obilježje enteropatije je narušena struktura crijevne sluznice, uslijed čega dolazi do smanjenja njene probavne i apsorpcijske funkcije (Vighi i sur., 2008).

Astma također može biti jedna od manifestacija alergijske reakcije na hranu. Ponekad ona može biti glavni simptom, ali češće se javlja uz ekcem, urtikariju, sindrom alergije na pelud (tj. alergije na hranu izazvane senzibilizacijom na inhalirane alergene) ili gastrointestinalne simptome. Simptomi astme mogu imati velik udio u općoj anafilaktičkoj reakciji. Nadalje, astmatičari koji su također alergični na hranu u većoj su opasnosti od razvijanja akutnih simptoma anafilaktičke reakcije na hranu. Namirnice koje su okidači alergijske astme slične su općem alergijskom obrascu prevalencije uočenom unutar društva. Prilikom procjene pojedinca s poviješću astme povezane s alergijom na hranu, neophodno je razmotriti komorbiditet vezan uz alergene iz okoline. Većinu reakcija na sulfite obilježava bronhospazam, povremeno akutan, koji se može javiti unutar nekoliko minuta po konzumiranju hrane ili pića koji sadrže sulfite. Edem larinksa, oticanje sluznice larinksa, često je dio anafilaktičke reakcije na hranu i može dovesti do opstruckije dišnih puteva te, u najgorem slučaju, do zastoja disanja (Summers i sur., 2008). Alergijski je rinitis također moguć simptom alergije na hranu, premda je rjeđi nego simptomi astme (Oehling i sur., 1992). Simptomi nalik rinitisu uočeni su u brojne djece alergične na pelud uz alergije na kravlje mlijeko i jaja (Balatsouras i sur., 2011).

Glavni oblik alergijske reakcije očiju je konjuktivitis, kod kojeg se javlja crvenilo, oticanje i svrbež površine očiju i unutrašnjosti kapaka. Konjuktivitis je često, iako ne uvijek,

praćen rinitisom i konjuktivitis se općenito javlja rjeđe od rinitisa. Uočena je veza između pojave konjuktivitisa u pojedinaca senzibiliziranih na pelud i konzumiranja specifičnih namirnica, premda rjeđe nego kod simptoma astme (Kurosaka i sur., 2011).

Anafilaksija je akutno, potencijalno po život opasno i ponekad fatalno stanje, koje zahvaća kardiovaskularni sustav, dišni sustav, usta, ždrijelo i kožu, pojedinačno ili kombinirano (Sampson, 2006). Glavni tip stanica uključenih uslijed oslobađanja vazoaktivnih medijatora predstavljaju eozinofili, mastociti i bazofili. Reakciju mogu pokrenuti i IgE i IgG (IgG1 > IgG4) protutijela, ovisno o tipu stanica (Tsujimura i sur., 2008). Početni simptomi nerijetko zahvaćaju kožu ili orofarinks. Simptomi, njihov slijed i izraženost mogu varirati od jedne do druge epizode i ovise o pojedincu. Kod fatalne anafilaksije prouzrokovane hranom početni simptomi tipično se razvijaju unutar 3 do 30 minuta, a akutni respiratorni simptomi od 20 do 150 minuta nakon izlaganja (Pumphrey i Gowland, 2007). Neke reakcije, pak, mogu imati dvije faze i krenuti s blagim početnim simptomima. Astmatičari s alergijama na hranu nalaze se u visoko rizičnoj skupini za razvijanje akutnih anafilaktičkih reakcija na hranu (Gonzalez-Perez i sur., 2010).

2.4. Dijagnoza alergije na hranu

Dijagnoza nepovoljnih imunosnih reakcija na hranu i pojedine namirnice ovisi o kliničkom uvidu, tumačenju povijesti i kliničkog ispitivanja pacijenta. Dijagnoza alergije na hranu često je otežana zbog subjektivne prirode i širokog spektra simptoma te nedostatka objektivnih kliničkih obilježja (Boyce i suradnici., 2011) te su stoga objavljene smjernice i protokoli za kliničko dijagnosticiranje alergije na hranu (Muraro i sur., 2014). Anamneza pacijenta, a osobito vrijeme između izlaganja i reakcije ključni su za dijagnozu. Atopija u obiteljskoj anamnezi povećava sumnju na imunosno uzrokovane nepovoljne reakcije na hranu. Međutim, nedostatak obiteljske anamneze ne isključuje dijagnozu alergije na hranu ili alergijsko podrijetlo kliničkih simptoma. Važan podatak glede uzroka koju pojedina namirnica može imati kod razvijanja simptoma moguće je apstrahirati eliminacijskom dijetom, tj. kada uklanjanjem dotične namirnice iz prehrane nestaju simptomi.

2.4.1. Provokacijski testovi na hranu

Određena namirnica može biti ponuđena izravno (ispitanici su svjesni da im je dana dotična namirnica, nema uporabe placeba), kroz jednostruko-slijepo placebo kontrolirani provokacijski test SBPCFC (engl. single-blind placebo-controlled food challenges); ispitanici ne znaju dobivaju li dotičnu namirnicu ili placebo), ili kroz dvostruko-slijepo placebo kontrolirani provokacijski test DBPCFC (engl. double-blind placebo-controlled food challenges); ni ispitanici, ni ispitivači ne znaju je li ponuđena dotična hrana ili placebo). Rezultate izravnog testiranja na hranu u kome ispitanik zna što uzima OFC (engl. oral food challenge) teže je tumačiti nego rezultate SBPCFC-a (tj. teško je pripisati odgođene ili subjektivne simptome konzumiranju dotične hrane u odsustvu placeba). DBPCFC testovi su skupi, vremenski zahtjevni i teški za provođenje. OFC testove često odbijaju pacijenti, njihovi roditelji ili liječnici zbog rizika od akutne reakcije kod visoko osjetljivih pojedinaca u slučaju nepoduzimanja odgovarajućih mjera. DBPCFC testiranje je, pak, prihvaćeno kao zlatni standard jer je subjektivna pristranost otklonjena.

2.4.2. Određivanje razine ukupnog i specifičnog imunoglobulina E u uzorku seruma

Određivanje razine ukupnog i specifičnog IgE važno je u laboratorijskoj dijagnostici alergijskih reakcija. Osnovni princip ovih testova je specifična reakcija vezivanja antigena i protutijela. Klinička osjetljivost i specifičnost ovih pretraga kod dijagnoze alergije na hranu ovise o uvjetima njihova provođenja. Specifični imunoglobulini E (IgE) posreduju osjetljivost na određenu hranu, no ne nude informacije o pojavljivanju i jačini alergijskih reakcija nakon oralnog izlaganja dotičnoj hrani (Soares-Weiser i sur., 2014). Određivanje ukupnog IgE podrazumijeva mjerenje koncentracije IgE neovisno o specifičnosti.

Testovi koji se najčešće koriste pri određivanju **ukupnog IgE** su:

a) radioimunosorbentni test - **RIST** (engl. Radio Immuno Sorbent Test),

b) fluoroimunotest - **FIA** (engl. Fluoro Immuno Assay),

c) fluoroenzimimunotest - **FEIA-CAP** Siystem (engl. Fluoro Enzyme Immuno Assay).

Određivanje **specifičnih IgE** otkriva potencijalnu senzibilizaciju na više alergena iz jednog uzorka krvi. Velika prednost određivanja specifičnih IgE nad kožnim ubodnim testom pokazala se kada pacijenti nisu u mogućnosti prekidati terapiju zbog testiranja (koja dovodi do lažno negativnog kožnog ubodnog testa), kod pacijenata koji ne žele surađivati te kod pacijenata kod kojih bi dodir sa alergenom uzrokovao anafilaktičku reakciju.

Za određivanje **specifičnog IgE** u upotrebi su:

a) radioalergosorbentni test - **RAST** (engl. Radio Allergo Sorbent Test) ,
b) radioalergosorbentni test na hidrofilnom polimernom nosaču – **ImmunoCAP® sistem**,
c) FABER test.

Krvne pretrage tipa RAST često se zamjenjuju kvantitativnim imunokemijskim pretragama s ciljem utvrđivanja razine IgE protutijela specifičnih za određenu hranu. ImmunoCAP® je automatizirani kvantitativni test za *in vitro* mjerenje cirkulirajućeg specifičnog IgE antitijela u serumu ili plazmi. Alergen se veže na hidrofilni polimerni nosač-ImmunoCAP® , a odlikuje ga visoka specifičnosi i osjetljivost. FABER test predstavlja najnoviji dijagnostički alat za laboratorijsko ispitivanje alergijskih bolesti, a razvijen je koristeći se suvremenom nanotehnologijom i detaljno je opisan u poglavlju 4.1.

2.4.3. Kožni ubodni test

U slučaju sumnje na IgE uzrokovane imunosne reakcije na hranu može se provesti kožni ubodni test (engl. skin prick test, SPT). Pozitivna reakcija očituje se razvijanjem urtike u obliku kotača čiji promjer se mjeri kako bi se utvrdio stupanj reakcije. Pozitivan SPT ukazuje na osjetljivost na testiranu hranu, no to nije dijagnoza alergije na hranu. IgE protutijela alergeno-specifičnog seruma upućuju na osjetljivost na određenu hranu, no ne predstavljaju dijagnozu bez kliničke povijesti ili provokacijskih testova.

2.5. Različiti pristupi suzbijanju alergija na hranu

Kod alergije na hranu primarno je isključiti iz prehrane dotičnu alergenu hranu te izbjegavati nehotično izlaganje istoj u nekontroliranim uvjetima, tj. na putovanjima, u restoranima, kao i izlaganje hrani bez deklaracije (Burks i sur., 2011). Majkama isključivo dojene djece s alergijom na hranu (s kliničkom dijagnozom alergije na hranu) također se savjetuje eliminacijska dijeta, jer majčino mlijeko može sadržavati alergene u količini

dostatnoj za izazivanje nepovoljne reakcije u dojenčadi te održavati proces bolesti u pozadini (Koletzko i sur., 2012).

Indukcija sustavne oralne tolerancije (SOTI) na proteine davno je prepoznata i često demonstrirana u biološkim eksperimentima. Mehanizmi u pozadini indukcije oralne tolerancije i procedura desenzibilizacije i dalje su predmet znanstvenih istraživanja (Eigenmann i sur., 2008). Prednost SOTI je povećanje minimalne doze određene alergene hrane u pojedinca te ujedno i smanjenje rizika od javljanja akutnih alergijskih reakcija nakon nehotičnog konzumiranja dotične hrane. Sublingvalna imunoterapija (SLIT) uglavnom se primjenjuje za liječenje alergijskih bolesti koje izazivaju alergeni iz okoline te rijetko kod alergije na hranu (Larenas-Linnemann, 2009). Brojni alergeno-specifični i alergeno-nespecifični imunoterapijski pristupi dosegli su fazu kliničkih ispitivanja (Nowak-Wegrzyn i Sampson, 2011). U alergeno specifične ubraja se epikutana imunoterapija (Dupont i sur., 2010), a anti-IgE terapija (Wang i sur., 2010), kineska terapija biljem (Srivastava i sur., 2009) i anti-citokinska terapija (Straumann i sur., 2010) se ubrajaju u alergeno-nespecifične. Izbjegavanje specifičnih alergena u hrani u prehrani u kombinaciji s nutricionističkim savjetima glavno je uporište postupanja s IgE i ne-IgE uzrokovanom alergijom na hranu. Savjetuje se redovita reevaluacija alergije kako bi se izbjegle nepotrebne restrikcije u prehrani.

2.6. Epidemiologija alergije na hranu

Dostupne su brojne publikacije na temu prevalencije alergija na hranu. Međutim, pouzdanost tih procjena i kako se one odražavaju na stvarnu zastupljenost alergija na hranu unutar opće populacije ovise o kriterijima dijagnosticiranja alergije i o izboru proučavane populacije. Razlike u odabiru uzorka i dijagnostičkim kriterijima mogu ugroziti usporedbu rezultata različitih istraživanja, a samim tim i zaključke o trendovima. Većina se istraživanja oslanja na samoprijavljene nepovoljne reakcije na hranu prilikom procjenjivanja prevalencije alergije na hranu (Nwaru i sur., 2014). Jednostavno se provode (uglavnom se zasnivaju na upitnicima) i mogu uključivati veliki broj ispitanika iz opće (neodabrane) populacije. Takva istraživanja precjenjuju prevalenciju alergije na hranu i ne diferenciraju je od neimunosnih reakcija na hranu, no pružaju uvid u razmjer ispitanika koji se drže određenih prehrambenih restrikcija kako bi izbjegli konzumiranje pojedinih namirnica bez obzira pate li od alergije na hranu ili ne (Soller i sur., 2012).

Pozitivni DBPCFC testovi predstavljaju pouzdan način dijagnosticiranja alergije na hranu. Međutim, ispitivanja koja koriste DBPCFC testiranje pri dijagnozi obično se provode na probranim ispitanicima s visokom sumnjom na alergije na hranu, isključuju visoko senzibilizirane pojedince, teško ih se provodi i općenito rađena su na malom uzorku. OFC testovi lakše se provode, no u nedostatku placeba, teško je utvrditi povezanost između uzimanja hrane i odgođenih subjektivnih simptoma. Općenito, smatra se da bi za određivanje stvarne prevalencije alergije na hranu trebalo napraviti ispitivanje unutar opće populacije primjenjujući višestupanjski dijagnostički pristup uz potvrdu alergije koristeći DBPCFC testove, no takva se ispitivanja zasad još nisu redovito provodila. Čim to bude bilo moguće promatrat će se samo podaci o prevalenciji za opću populaciju ili za pojedinu dobnu skupinu unutar opće (neprobrane) populacije, a ne podaci dobiveni ispitivanjem pojedinaca odabranih zbog njihove bolesti ili rizika od iste (Sicherer i Sampson, 2013). Podaci o prevalenciji u SAD-u, Kanadi, Australiji i na Novom Zelandu smatraju se relevantnijima za praćenje trendova u Europi nego podaci o prevalenciji alergija u azijskim i afričkim zemljama.

Rona i suradnici (2007) proveli su istraživanje meta-analizom koja se sastojala od zasebne analize prevalencije alergije na hranu za 5 alergena (mlijeko, jaja, kikiriki, riba i školjke), razvrstane u dvije dobne skupine (djeca i odrasli). Razmatrali su se podaci za Europu, SAD i Australiju/Novi Zeland. Zajednička prevalencija samoprijavljene alergije na hranu za bilo koju od 5 navedenih namirnica iznosila je 12 % za odrasle i 13 % za djecu. Međutim, zajednički rezultati bili su niži (3 %) kada se dijagnosticiranje alergije na hranu zasnivalo na oralnim provokacijskim testovima za odrasle i djecu kombinirano. Cjeloživotna se prevalencija samoprijavljenih alergija na hranu u Europi procjenjuje na 17,3 %, dok trenutna prevalencija iznosi 5,9 %. U drugoj meta-analizi trenutna prevalencija bila je viša kod djece (6,9 %), nego kod odraslih (5,9 %) (Nwaru i sur., 2014). Međutim, nakon što je dijagnoza alergije na hranu potvrđena oralnim provokacijskim testovima, prevalencija alergije na hranu u Europi procijenjena je na svega 0,9 % (95 % CI: 0,8–1,1 %), kako kod odraslih, tako i kod djece.

Prevalencija samoprijavljenih, a i alergija potvrđenih provokacijskim testovima bila je niža u zemljama južne Europe nasuprot sjevernoj i zapadnoj Europi. Rezultati nekoliko istraživanja upućuju da je 75 % alergijskih reakcija u djece izazvano ograničenim brojem namirnica, poput jaja, kikirikija, kravljeg mlijeka, ribe i različitog orašastog voća (Dupont, 2011; Sastre, 2010). Među odraslima, pak, voće iz lateks skupine (npr. kivi, banana), voće iz porodice ružovki/Rosaceae (jabuke, kruške, šljive), povrće iz porodice štitarki/Apiaceae (npr.

mrkva, celer) i različito orašasto voće te kikiriki izazivaju 50 % svih alergijskih reakcija (Gadermaier i sur., 2011).

Dokazi upućuju da se prevalencija atopije povećala u posljednjih nekoliko desetljeća (Strannegard i Strannegard, 2001). Pritom također treba imati na umu i porast osviještenosti te veću medijsku pozornost koja se posvećuje alergiji na hranu.

Prevalencija alergije na hranu u razvijenim zemljama nije pouzdano utvrđena. Tomu je tako ponajviše radi nedovoljno provedenih istraživanja za pojedina geografska područja i radi neusuglašene metodologije korištene u različitim istraživanjima prevalencije. Uzevši provokacijske testove kao kriterij za dijagnozu, prevalencija alergije na hranu iznosi oko 3 % kada se promatraju podaci za Europu, SAD, Australiju i Novi Zeland, te oko 1 % uzevši samo europske zemlje – kako u odraslih, tako i u djece. Međutim, postoji velika neujednačenost među istraživanjima prevalencije alergije na hranu. Ne postoji dovoljno objektivnih podataka kako bi se donio zaključak o trendovima prevalencije alergije na hranu u Europi.

Za pojavu alergija općenito, a osobito alergija na hranu neophodna je podložnost pojedinca te njegovo izlaganje alergenu. Kod prevalencije alergije na hranu zemljopisne varijacije uvjetovane su genetičkim faktorima te regionalnim i lokalnim faktorima, poput izlaganja peludi te razlikama u prehrambenim navikama. Nadalje, pojedina hrana je više alergena od druge, tj. ima veći kapacitet za izazivanje alergijske osjetljivosti te alergijskih reakcija kod opće populacije. U takvu hranu se ubrajaju primjerice, mlijeko, jaja, riba, morski plodovi, kikiriki i ostali orašasti plodovi, soja, sezam i celer. Druga hrana, npr. krumpir, rjeđe izaziva alergiju, unatoč visokom stupnju konzumiranja. Količina unesenog alergena predstavlja bitnu odrednicu alergije na hranu, a ovisi o količini pojedine alergene hrane koju se redovito konzumira (prehrambene navike).

Proteini koji su zastupljeni u velikoj količini u hrani imaju veću mogućnost postati alergenima od proteina koji su zastupljeni u maloj količini. Količina alergena u hrani ovisi o vrsti biljke te uvjetima njenog uzgoja, te otuda i zemljopisne varijacije kod pojedinih alergija na hranu, kao i varijacije u stupnju alergenosti određene biljke tj. proizvoda (Codina i sur., 2003). Općenito, u zemljopisnim područjima gdje je određena hrana uvriježena, veći je rizik od alergija na dotičnu hranu u odnosu na područja u kojima se ta hrana rjeđe konzumira. Prerada i priprema hrane mogu povećati ili smanjiti njezinu alergenost.

S obzirom na lokalnu tradiciju i socioekonomske uvjete, ista sirova hrana može biti prerađena i pripremljena na različite načine.

Spol, dob, povijest atopije u obitelji te prisustvo drugih alergijskih bolesti ubrajaju se u individualne čimbenike ključne za razvoj alergije na hranu. Povijest alergije na hranu u obitelji glavni je faktor rizika kod razvoja alergije na hranu. Primjerice, kod osoba s bratom ili sestrom s alergijom na kikiriki rizik od iste alergije je peterostruk (Hourihane i sur., 1996). Incidencija alergije na hranu općenito se mijenja s dobi (Osterballe i sur., 2005; Pereira i sur., 2005; Venter i sur., 2008; Zuidmeer i sur., 2008).

Alergije na mlijeko i jaja prilično su česte u dojenčadi, no često se prerastu u ranom djetinjstvu. Nasuprot tome, alergija na školjke češća je u odraslih nego u djece, dok je alergija na kikiriki češća u djece nego kod odraslih.

Nije sustavno istraženo u kojoj mjeri spol utječe na pojedinačnu podložnost alergiji na hranu. Kod odraslih, čini se da je alergija na hranu nešto češća kod žena nego muškaraca (Schafer i sur., 2001). Također nema dovoljno podataka o razlikama na temelju spola kod dječje alergije na hranu, premda se čini da je ona češća kod dječaka nego djevojčica (Ben-Shoshan i sur., 2012). Većina (Gupta i sur., 2011), iako ne sva (Victorino i Gauthier, 2009) istraživanja pokazuju da je veći postotak alergije na hranu primijećen kod populacije višeg socioekonomskog statusa. Međutim, također je moguće da je veza između manjeg rizika od alergije na hranu i nižeg socioekonomskog statusa proizvod više združenih čimbenika, poput načina hranjenja dojenčadi i okolišnih uvjeta.

Razlike glede prevalencije alergije na hranu među etničkim grupama potencijalno se može pripisati genetičkim razlikama i različitim prehrambenim navikama. Fizička aktivnost, alkohol, antibiotici, inhibitori želučane kiselosti te nesteroidni protuupalni lijekovi potencijalno povećavaju rizik od alergijskih reakcija na hranu (Sicherer i Sampson, 2013).

Važan dio naše prehrane čine voće i povrće, a u našem organizmu predstavljaju iznimno bitan i bogat izvor antioksidansa, vitamina, minerala, dijetalnih vlakana i ostalih nutritivno vrijednih tvari. Brojne studije pokazale su kako redovita konzumacija voća i povrća smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti, moždanog udara i hipertenzije (Boeing i sur., 2012; Oyebode i sur., 2014; Alissa i Ferns, 2017). Iako imaju veliku ulogu u očuvanju zdravlja, konzumacija voća i povrća predstavlja određeni rizik u smislu alergijskih reakcija izazvanih IgE protutijelima.

Alergijske reakcije su rezultat imunosnog odgovora na proteine prisutne u različitim oblicima voća i povrća koji koji se javlja nakon njihove konzumacije. Iako ove alergije nisu vrlo ozbiljne, one su češće u usporedbi s drugim alergijama i procijenjeno je da je oko 4,3% populacije osjetljivo na plodove voća i oko 1,4 % na povrće (Sicherer i sur., 2010). Navedeni udjeli su visoki jer većina glavnih alergena prisutnih u voću i povrću ima homolognu strukturu s polenombreze i drugim polenima, te mogu značajno utjecati na pojavu alergija u Europi i Sjevernoj Americi. Prema zadnjim procjenama, smatra se da je oko 40% populacije osjetljivo na alergene peludi, a 70 % od njih pokazuje preosjetljivost na voće i povrće (D'amato i sur. 2007). Nadalje, pokazalo se da je dio populacije koja je preosjetljiva na pelud breze, izložen većem riziku od pojave alergije na određeno voće i povrće (Eriksson i sur., 1982). Alergija se odnosi na dio homologne strukture proteina, koja rezultira sličnim epitopnim formacijama koje dovode do križne reaktivnosti. Alergija nastala prisustvom peludi breze, koja se najčešće uzgaja u Europi i nekoliko dijelova Sjeverne Amerike, ima visok rizik od križne reaktivnosti na jabuke, mrkvu i lješnjak.

Pelud ambrozije ima visoku sličnost s alergenima u dinji, banani i pelinu, a cvjetni prah ima veću sličnost s alergenima jabuke, celera i mrkve (Caballero i sur. 1994; White i sur. 2003). Zbog sličnosti u proteinskim strukturama, rizik od križne reaktivnosti je vrlo visok. Osjetljivost na određeno voće vrlo je varijabilna od područja do područja, ovisno o lokalnom stanovništvu i taksonomiji biljaka, što otežava praćenje pojava ovih alergija u različitim zemljama (Andersen i sur., 2011) te ukupnu procjenu epidemiologije alergija na voće i povrće u dijelovima Europe i Sjeverne Amerike.

U Francuskoj je provedena anketa na temelju upitnika među školskom djecom u dobi od 2 do 14 godina (Rance i sur. 2005). Ukupno 182 djece prijavljeno je da su alergični na neku vrstu hrane, od kojih je 12 % izjavilo da su preosjetljivi na kivi, 5,5 % na rajčice, 4,4 % na jagode, 3,8 % na ananas, 2,7 % na naranče i oko 1,2 % na jabuke.

Daljnja istraživanja provedena na njemačkoj populaciji pokazala su da su jabuke, mrkva i kivi najčešći uzročnici alergijskih reakcija. Dobiveni rezultati pokazuju da je 2,7 % ljudi osjetljivo na mrkvu, a 1,7 % na jabuke. Zaključili su da su voće, orašasti plodovi i povrće među najčešćim uzročnicima alergija na hranu za odrasle osobe i djecu (Zuberbier i sur., 2004;Roehr i sur., 2004). Ispitivanja prevalencije alergije provedena na populaciji Danske pokazala su da su alergije na voće i povrće najčešće i iznose 2,7 %.

Istraživanja provedena u južnoj Europi pokazala su da alergija na voće prevladava u Španjolskoj i Italiji, s plodovima obitelji *Rosaceae* koja je najveći uzročnik alergijskih reakcija, nakon čega slijede kivi, dinje i lubenice. Rajčica, celer i zelena salata također su bili vrlo česti uzročnici alergijskih reakcija u tim zemljopisnim područjima.

Iako u Sjevernoj Americi nedostaju opsežne studije, stručnjaci su procijenili da je 1,2 % stanovništva preosjetljivo na voće i povrće (Sicherer i sur., 2001). Procjene u ovoj studiji pokazuju da pacijenti koji su alergični na brezu i ambroziju imaju 55 % povećan rizik za alergiju na voće i povrće, a za pacijente koji su alergični na breskve, postoji 55 % rizika da postanu alergične na druge plodove obitelji *Rosaceae*. U slučaju preosjetljivosti na dinje rizik raste do 92 %, a postoji veća mogućnost da su ti pojedinci alergični na lubenice, avokado i banane (Sicherer i sur., 2001).

2.7. Alergeni u hrani

Alergenost pojedine vrste hrane ne potječe nužno iz jedne proteinske komponente već iz različitih proteina pojedine hrane. Združivanjem znanosti o hrani i medicinske znanosti definirani su klinički relevantni alergeni iz različitih namirnica koji su izolirani, pročišćeni i karakterizirani.

Svjetska zdravstvena organizacija usvojila je sustavnu Nomenklaturu alergena Međunarodne unije imunoloških društava (IUIS). Prema dogovoru, alergeni u sustavnoj IUIS nomenklaturi označeni su s prva tri slova roda kome pripadaju, prvim slovom naziva (pod)vrste prema Linnéovom sustavu taksonomije te oznakom arapskog broja koji odražava kronološki redoslijed prema kome je alergen određen i karakteriziran. Alergenost proteina proizlazi iz IgE-vezujućih epitopa. Poput alergena, ni sve epitope u proteinu ne prepoznaju svi pacijenti alergični na dotični protein: neki epitopi su imunodominantni, a neke prepoznaju samo neki pacijenti.

Mrežna stranica http://www.allergen.org službena je mrežna stranica za sistematsku nomenklaturu alergena koju odobrava Svjetska zdravstvena organizacija i Međunarodna unija imunoloških društava (WHO / IUIS), sadrži popis svih poznatih alergena te se redovito ažurira. Popis tvari ili proizvoda koji uzrokuju alergije ili intolerancije nalazi se u Prilogu II. Uredbe (EU) br. 1169/2011 Europskog parlamenta i Vijeća od 25. listopada 2011. o informiranju potrošača o hrani.

Popis uključuje:

Žitarice koje sadrže gluten (pšenica, raž, ječam, zob, pir, kamut ili njihovi križanci, te proizvodi od tih žitarica); **rakovi** i proizvodi od rakova; **jaja** i proizvodi od jaja; **riba** i riblji proizvodi; **kikiriki** i proizvodi od kikirikija; **zrna soje** i proizvodi od soje; **mlijeko** i mliječni proizvodi (uključujući laktozu); **orašasto voće**, tj. bademi, lješnjaci, orasi, indijski oraščići, pekan orasi, brazilski orasi, pistacije, makadamije ili kvinslandski orasi te njihovi proizvodi; **celer** i njegovi proizvodi; **gorušica** i proizvodi od gorušice; **sjeme** sezama i proizvodi od sjemena sezama; **sumporni dioksid** i sulfiti pri koncentracijama većim od 10 mg/kg ili 10 mg/L računati kao ukupni SO_2; **lupina** i proizvodi od lupine; **mekušci** i proizvodi od mekušaca.

2.7.1. Alergeni biljnog podrijetla

Baza podataka proteinskih porodica Pfam (El-Gebali i sur., 2019), te baza podataka porodica alergena Allfam (Radauer i sur., 2008) klasificiraju biljne alergene na četiri glavne porodice na osnovu homologije aminokiselinskog slijeda, prostorne strukture i funkcije:

a) nadporodica prolamina;
b) nadporodica kupina;
c) profilini;
d) nadporodica Bet v 1.

Ove četiri porodice alergena čine 65% ukupnih biljnih alergena.

U nadporodicu **prolamina** ubraja se najveći broj biljnih alergena: 2S skladišni albumini iz sjemenki; nespecifični proteini za prijenos lipida (engl. non specific Lipid Transfer Proteins, nsLTPs); inhibitori α-amilaze/tripsina. U ovu skupinu se ubraja većina alergena orašastog voća, sjemena sezama i gorušice. Inhibitori amilaze i proteaza izazivaju određenu rezistenciju tkiva biljke na pesticide i uključuju alergene prisutne u pšenici, ječmu, riži i kukuruzu (Pastorello i sur., 2002).

2S albumini su bogati glutaminom i argininom, aminokiselinama koje sadrže 2 odnosno 3 atoma dušika te stoga osiguravaju učinkovito skladištenje dušika. Međutim, 2S albumini sadrže i visok sadržaj aminokiselina sa sumporom, cisteina i metionina. Svi sadrže 8 cisteinskih ostataka i imaju veće udjele cisteina u odnosu na druge proteine. Najviše proučavani albumini 2S su napini iz uljane repice (lat. *Brassica napus*) (Slika 3). Najvažnija

biološka uloga albumina 2S je skladištenje, osiguravanje rezervi dušika, ugljika i sumpora za potporu klijanju i rastu.



Slika 3. Kompaktna prostorna struktura prolamina – 2S albumin - napin iz uljane repice (Monsalve i sur., 2001).

Važna strukturna značajka albumina 2S u odnosu na alergenost jest njihova kompaktnost koja proizlazi iz njihovog rasporeda disulfidnih veza, a odražava se u toplinskoj stabilnosti, otpornosti na djelovanje proteolitičkih enzima te interakcijama s membranama. Navedena svojstva mogu biti temelj njihovih svojstava kao alergena na hranu, budući da su otpornost na probavu i interakcija s membranama ključni čimbenici za alergenost sastojaka hrane. Ta svojstva omogućuju da proteini dođu do gastrointestinalnog trakta gotovo netaknuti, te bi također pogodovala povećanom staničnom unosu, smanjenoj neutralizaciji protutijelima i smanjenoj razgradnji u krvotoku (Astwood i sur. 1996; Asero i sur. 2000).

Rane studije izvijestile su o alergenim 2S albuminima u grašku (Malley i sur. 1975), sjemenu pamuka (Youle i Huang ,1979), soji (Shibasaki i sur. 1980) i ricinusu (Sharief i Li , 1982), a u Tablici 2. navedeni su oni koji su karakterizirani tijekom zadnja tri desetljeća.

Tablica 2. Primjeri biljnih alergena 2S albumina

Alergen	**Vrsta biljke**	**Molekularna masa (Da)**	**Literaturni navod**
Sin a 1	*Sinapis alba* (bijela gorušica)	14180	Menéndez-Arias i sur., 1988
Bra j 1	*Brassica juncea* (smeđa gorušica)	14644	Monsalve i sur., 1993
Bra n 3	*Brassica napus* (uljana repica)	14035	Monsalve i sur. 1997
Bnlb	*Brassica napus* (uljana repica)	12691	Villalba i sur., 2000
Ric c 1	*Ricinus communis* (ricinus)	11212	Bashir i sur., 1998
Ric c3	*Ricinus communis* (ricinus)	12032	Bashir i sur., 1998
Ber e 1	*Bertholletia excelsa* (brazilski oraščić)	12218	Nordlee i sur., 1996
SFA8	*Helianthus annuus* (suncokret)	12155	Kelly i sur., 2000
Ara h 2	*Arachis hypogaea* (kikiriki)	16637	Stanley i sur., 1997

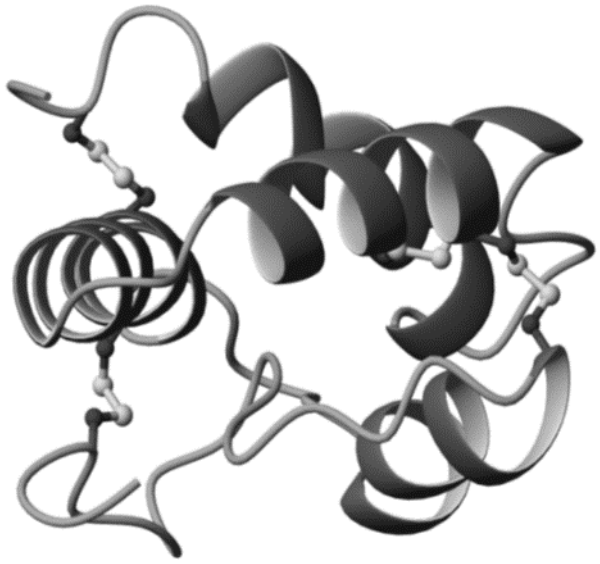
Nespecifični proteini za prijenos lipida (nsLTP) su sveprisutni proteini u biljnom svijetu koji mogu poboljšati međumembranski prijenos. Do sada su identificirane dvije glavne porodice, a to su nsLTP1 (9 kDa) i nsLTP2 (7 kDa). Pri tome su nsLTP1s rašireni kao alergeni u hrani biljnog podrijetla (voće, žitarice) i u peludi, dok je nsLTP2 snažan alergen samo u peludi repe (Tablica 3).

Tablica 3. Primjeri biljnih alergena nsLTP (Marion i sur. 2004)

Vrsta biljke	**Dio biljke**	**Alergen**
Ambrozija ***Ambrosia artemisiifolia***	Pelud	Amb a6
Pelin ***Artemisia vulgaris***	Pelud	Art v3
Maslina ***Oleae europaea***	pelud	Ole e7
Kukuruz ***Zea mays***	sjemenka	Zea m 14
Jabuka ***Malus domestica***	plod	Mal d 3
Marelica ***Prunus armeniaca***	plod	Pru ar 3
Šljiva ***Prunus domestica***	plod	Pru d 3
Breskva ***Prunus persica***	plod	Pru p 3
Kruška ***Pyrus communis***	plod	Pyr c 3

Struktura LTP pšenice prikazana je na Slici 4. gdje je vidljiva kompaktna konformacija s visokim udjelom α-uzvojnice koja je stabilizirana s četiri intramolekularna disulfidna mosta (Desormeaux i sur. 1992).

Prisutnost ovih disulfidnih veza neophodna je za održavanje strukture proteina i vjerojatno je odgovorna za visoku toplinsku stabilnost nsLTP1. Sva dosadašnja istraživanja ukazuju na ključnu ulogu nsLTPs u rezistenciji biljke prema biotičkim i abiotičkim stresovima što je u skladu s njihovom ekspresijom u epidermalnim tkivima biljaka i njihovoj izvanstaničnoj lokaciji. Da bi se objasnile ove biološke uloge, nsLTP-ovi su vjerojatno uključeni u formiranje hidrofobnih zaštitnih slojeva biljke (kutin i suberin) te inhibiciju rasta gljivica ometanjem propusnosti njihovih membrana.



Slika 4. Struktura prolamina - LTP-a pšenice (Gincel i sur., 1994)

U **inhibitore α-amilaze/tripsina** ubraja se veliki dio proteina koji su povezani s alergijama izazvanima udisanjem ili konzumacijom proizvoda dobivenim od žitarica *Triticaceae* kao što su pšenica, ječam i raž. Strukturu ovih proteina karakteriziraju polipeptidi molekulske mase 12–16 kDa, obično bogati glutaminskim, asparaginskim i prolinskim ostacima te s četiri ili pet disulfidnih mostova koji su bitni za njihovu inhibitorsku aktivnost.

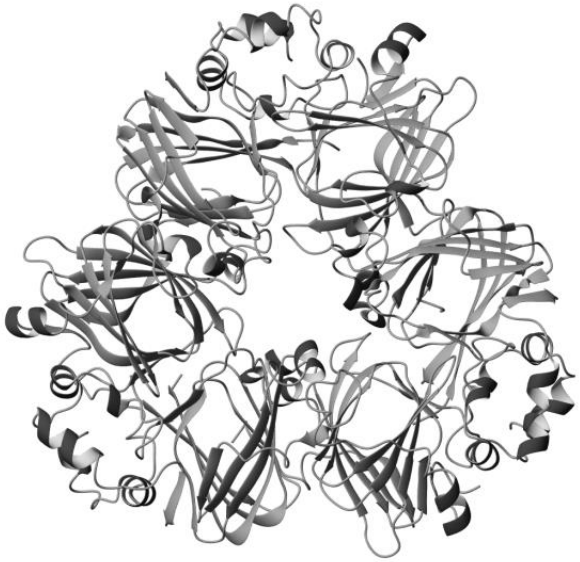
Nadporodica kupina uključuje glavne skladišne proteine - globuline, i to legumine (11S) i viciline (7S) koji uzrokuju većinu alergijskih reakcija na leguminoze i orašasto voće (Tablica 4).

Tablica 4. 7S i 11S globulini iz nadporodice kupina (Breiteneder i Radauer, 2004)

	KUPINI	
Biljka	7S	11S
Soja	Gly m 5	Gly m 6
Kikiriki	Ara h 1	Ara h 3
Pistacija	Pis v 3	Pis v 5
Lješnjak	Cor a 11	Cor a 9
Orah	Jug r 2	Jug r 4

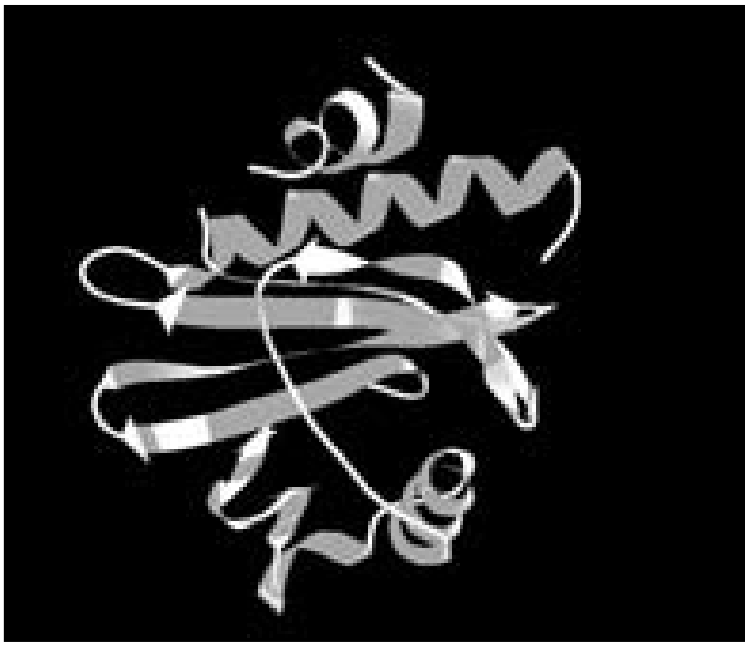
Kupini su, općenito, vrlo stabilni proteini. Obje skupine kupina, i 11S i 7S globulini, pokazuju značajnu toplinsku stabilnost. Utvrđeno je da 7S globulini imaju glavni denaturacijski prijelaz pri 70-75 °C, dok se 11 S globulini denaturiraju pri temperaturama iznad 94 °C. Uz to što toplina utječe na strukturu proteina, ona također dovodi do kovalentnih modifikacija, a između njih su svakako najvažnije one koje uključuju glikaciju i Maillardove reakcije. Navedene modifikacije mogu utjecati na alergijsku aktivnost globulina, povećanu termostabilnost te otpornost na probavljivost. Na primjer, alergenost 7S globulina kikirikija, Ara h 1, se povećava nakon Maillardovih reakcija. Doista, dokazano je da postupci pripreme kikirikija u vlažnoj sredini, kao što su prokuhavanje ili prženje, smanjuju njegovu alergenost, u usporedbi sa suhim prženjem (Zhang i sur., 2019).

Na Slici 5. prikazana je β-nabrana ploča konglicinina soje, karakteristična struktura svih članova nadporodice kupina.



Slika 5. Struktura kupina - β-konglicinina soje (Maruyama i sur., 2001)

Profilini su citosolni proteini od 12 do 15 kDa koji se nalaze u cvjetnjačama, poput kikirikija (Ara h 5), jabuke (Mal d 4) i celera (Api g 4), ali i peludi trava. Profilin pokazuje kompaktnu globularnu strukturu koja se sastoji od središnje sedmerostruke antiparalelne β-ploče s N-i C-terminalnim α-uzvojnicama na jednoj strani i jednom ili dvije α-uzvojnice na drugoj strani.



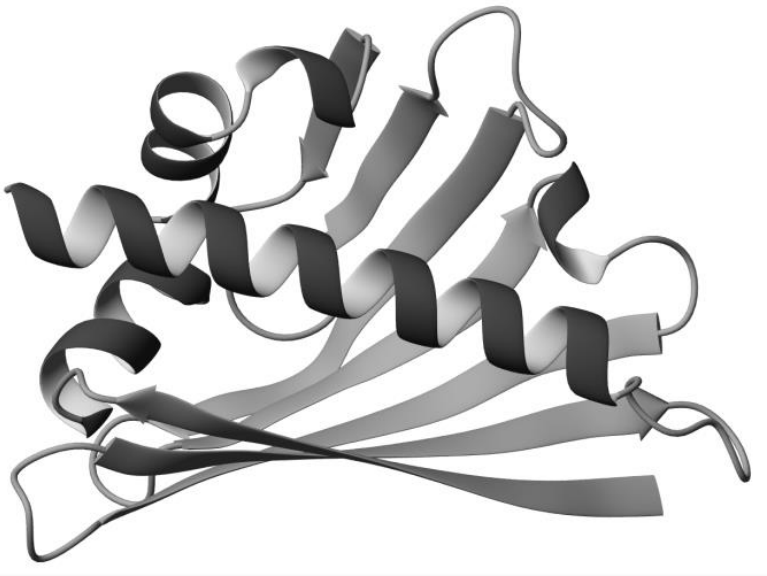
Slika 6. Struktura profilina - profilin peluda breze (Guex i Peitsch,1997)

Profilini sudjeluju u regulaciji polimerizacije aktinskih filamenata (koji se nazivaju i mikrofilamenti) koji su ključne komponente citoskeleta. Glavna uloga profilina je brza reorganizacija mikrofilamenata tijekom postupaka kao što su citokineza, kretanje stanica i elongacija stanica (Schluter i sur. 1997). Uloga profilina u alergijskim reakcijama na biljke otkrivena je 1991. godine. Dokazano je da je alergen Bet v 2 križno reaktivan ne samo s profilinima iz srodnih stabala (joha, lješnjak, grab i kesten), već i s profilinima iz peluda trava i korova. Malo je podataka o stabilnosti profilina, od kojih se većina odnosi na profiline celera. U usporedbi s drugim alergenima, profilini su umjereno stabilni proteini, stabilniji su od homologa Bet v 1, ali su manje stabilni od nespecifičnih proteina za prijenos lipida ili križno-reaktivnih ugljikohidratnih alergena glikoproteina (Marion i sur., 2004). Jedan od razloga za alergenost profilina je i njihova dobra topljivost u razrijeđenoj vodenoj otopini. Profilin je sada prepoznat kao minoran alergen u gotovo svakom istraživanom alergenom izvoru peludi (Tablica 5). Profilin specifični IgE otkriven je u 10-30 % seruma osoba alergičnih na pelud.

Tablica 5. Primjeri biljnih alergena profilina

Vrsta biljke	**kDa**	**Alergen**	**Literaturni navod**
Banana ***Musa acuminata***	14,0	Mus xp 1	Reindl i sur., 2002
Celer ***Apium graveolens***	14,3	Api g 4	Scheurer i sur., 2000
Trešnja ***Prunus avium***	14,0	Pru av 4	Scheurer i sur., 2001
Lješnjak ***Corylus avellana***	14,1	Cor a 2	Scheurer i sur., 2001
Kikiriki ***Arachis hypogaea***	14,1	Ara h 5	Quirce i sur., 2000
Ananas ***Ananas comosus***	14,2	Ana c 1	Reindl i sur., 2002
Kruška ***Pyrus communis***	14,1	Pyr c 4	Scheurer i sur., 2001

Nadporodica Bet v 1 dijeli se na osam porodica, među kojima su PR 10 proteini (engl. pathogenesis-related proteins) i glavni lateks proteini. Ovi su alergeni homologni glavnom alergenu peludi breze Bet v1 i nalaze se u voću iz porodice ružovki/Rosaceae (npr. jabuka, trešnja, marelica i kruška) te u povrću iz porodice štitarki/Apiaceae (npr. celer, mrkva) (Slika 7) (Halmepuro i sur. 1984). Prilično su osjetljivi na toplinu i proteaze. Inkubacija Mal d 1 i Bet v 1 s probavnim enzimima koji oponašaju gastrointestinalni trakt unutar nekoliko sekundi rezultiraju degradiranim proteinom. Njihova osjetljivost na proteaze objašnjava zašto homolozi Bet v 1 prvenstveno izazivaju alergijske reakcije u oralnoj sluznici i često ne uzrokuju opće ili gastrointestinalne probleme. Osim toga, konzumacija voća i povrća iz porodice ružovki nakon toplinske obrade ne predstavlja značajan izvor alergena za osobe s alergijom na alergene iz Bet v 1 nadporodice (Jankiewicz i sur. 1997).



Slika 7. Struktura Bet v 1- Api g 1 celera- β-struktura i C-terminalna α-uzvojnica (Schirmer i sur., 2005)

2.7.2. Alergeni životinjskog podrijetla

Alergeni iz hrane životinjskog podrijetla, koji su manje brojni od biljnih alergena, dijele se u tri glavne porodice: tropomiozini; EF-hand proteini i kazeini.

Tropomiozini su porodica srodnih proteina koji se nalaze u mišićima i drugim stanicama koje sudjeluju u kontrakciji mišića. EF-hand proteini su proteini karakteristične strukture (uzvojnica–petlja–uzvojnica) koje karakterizira sekvenca od obično 12 aminokiselinskih ostataka. Kazeini su proteini sisavaca prisutni u mlijeku koji vežu ione kalcija putem fosfoserinskih ili fosfotreoninskih ostataka αS1-, αS2- i β-kazeina tvoreći nanoklastere u kojima se nalazi amorfan kalcijev fosfat, stabiliziran k-kazeinom.

2.8. Križne reakcije

Do križne reakcije dolazi kada prvotno aktivirana IgE protutijela usmjerena na jedan antigen također vežu i drugi antigen. Nisu sve križne reakcije identificirane *in vitro* od kliničkog značaja, i premda je većina križnih reakcija posredovana IgE protutijelima, također mogu biti involvirane i T stanice (Bohle i sur., 2003). No, ipak, testiranje križnih reakcija *in*

vitro pomaže pri razumijevanju alergijskih reakcija na brojne namirnice te pospješuje dijagnozu i tretiranje alergije na hranu.

Primjer grupe visoko križno-reaktivnih alergena su profilini i LTP proteini, koji se općenito smatraju panalergenima (Bonds i sur., 2008). Panalergeni su definirani kao homologne molekule brojnih organizama koji uzrokuju IgE križnu reakciju između evolucijski nepovezanih vrsta (Hauser i sur., 2010). Do alergije na hranu može doći i uslijed osjetljivosti na inhalirane alergene, poput peludi. Primjer toga je tzv. peludni sindrom koji se najčešće manifestira kao OAS, premda su mogući sustavni simptomi. Kod brojnih pacijenata koji su alergični na pelud breze razvije se i alergija na jabuke, lješnjake, celer i mrkvu. Ovi pacijenti imaju specifična IgE protutijela na Bet v 1 ili Bet v 2 (profilin), glavne alergene peludi breze.

2.9. Stabilnost alergena iz hrane

Važno obilježje alergena je njihova stabilnost, koja se definira kao sposobnost zadržavanja izvorne trodimenzijske strukture uslijed toplinske, kemijske ili enzimske obrade. Glikoziliziranialergeni proteini su otporniji na proteolizu. U fiziološkim uvjetima ili uslijed industrijske obrade alergeni iz hrane s repetitivnom strukturom tvore nekovalentne agregate koji su osobito toplinski stabilni. Tropomiozini iz školjki i skladišni proteini pripadaju ovoj kategoriji. Probavljivost alergena *in vitro* proučava se s ciljem biokemijskog mjerenja njihove fizičko-kemijske stabilnosti u nefiziološkim uvjetima, kao i s ciljem istraživanja uloge probave na njihov alergijski potencijal u simuliranim fiziološkim uvjetima. Probavljivost proteina ovisi o njegovoj strukturi, ali i o matriksu hrane čiji je on dio, što može spriječiti ili, pak, pogodovati dostupnosti proteina probavnim enzimima.

Prvi postupak kod karakterizacije strukture alergena je ekstrakcija proteina iz namirnice u odgovarajućoj količini koja omogućava karakterizaciju strukture spektrometrijskim i spektroskopskim metodama.

Pročišćavanje proteina postiže se jednodimenzijskim razdvajanjem na SDS-poliakrilamidnoj gel elektroforezi (SDS-PAGE) ili kromatografskim metodama, koristeći različite kolone ovisno o prirodi proteina. Sekvenciranje i/ili fizičko-kemijske metode koriste se za potvrđivanje identiteta pročišćenog alergena (Harrer et al., 2010). Takve metode omogućavaju otkrivanje i jednoznačno utvrđivanje alergena zbog njihove specifičnosti i osjetljivosti (Monaci i Visconti, 2009).

Postoje dvije strategije za identifikaciju proteina pomoću masene spektrometrije: "bottom-up" i "top-down" strategija. „Bottom-up" strategija može se odvijati prateći dva slijeda: (i) proteine se najprije frakcionira i separira te se pojedinačni protein razgradi s jednim ili više proteolitičnih enzima u gelu, otopini ili koloni; potom se dobiveni peptidi analiziraju uz pomoć masene spektrometrije (MS); (ii) proteini se razgrade bez prethodnog frakcioniranja te se nakon toga peptidi razdvajaju pomoću višedimenzijske kromatografije te identificiraju uz pomoć MS/MS tehnike. Kod "top-down" strategije, protein je ioniziran i izravno fragmentiran u MS, bez prethodne provedene razgradnje.

Identificiranje epitopa važno je za karakterizaciju alergena iz hrane. Sekvencijalni epitopi mogu se identificirati uz pomoć metode ELISA (engl. enzyme linked immunosorbent assay) koristeći serume pacijenata. Neophodno je poznavanje trodimenzijske strukture alergena kako bi se došlo do informacija na površini proteina, te pružio dokaz o epitopima i procijenila potencijalna križna reakcija. Prostorna strukturu alergenog proteina u krutom stanju može se odrediti pomoću rendgenske kristalografije te u otopini nuklearnom magnetskom rezonantnom spektrometrijom (NMR), spektroskopijom i cirkularnim dikroizmom (CD).

Slijedom razvoja proteomike, spektroskopskih metoda i kloniranja gena, alergeni proteini mogu se dobro karakterizirati. Klasificirani su u kategorije na osnovu njihove sekvence i trodimenzijske strukture. Međutim, premda su opća strukturna obilježja proteina i njihova biološka aktivnost dovedena u vezu s njihovom imunogenošću, nije moguće predvidjeti alergenost proteina na osnovu samo ta dva parametra. Za klasifikaciju pojedinog proteina kao alergena neophodni su imunosni i klinički podaci.

2.10. Utjecaj obrade hrane na alergenost

Obrada hrane uključuje niz različitih fizikalnih i kemijskih postupaka, pri čemu se oni koriste pojedinačno ili u kombinaciji, što prvenstveno ovisi o materijalu koji se obrađuje te o željenim ishodima. Metode obrade hrane mogu biti **mehaničke** (razdvajanje, izolacija, pročišćavanje), **toplinske** (blanširanje, pasterizacija, sterilizacija, kuhanje i prženje) ili **biokemijske prirode** (enzimska obrada hrane) (Paschke, 2009). Mogu se također podijeliti na **konvencionalne i nove metode** obrade hrane čija je uporaba u novije vrijeme sve češća.

U glavne modifikacije ubrajaju se odmatanje i agregacija proteina, proteoliza, glikozilacija i glikacija, topljivost i utjecaj pH te prelazak iz mreže u gel-stanje, što može

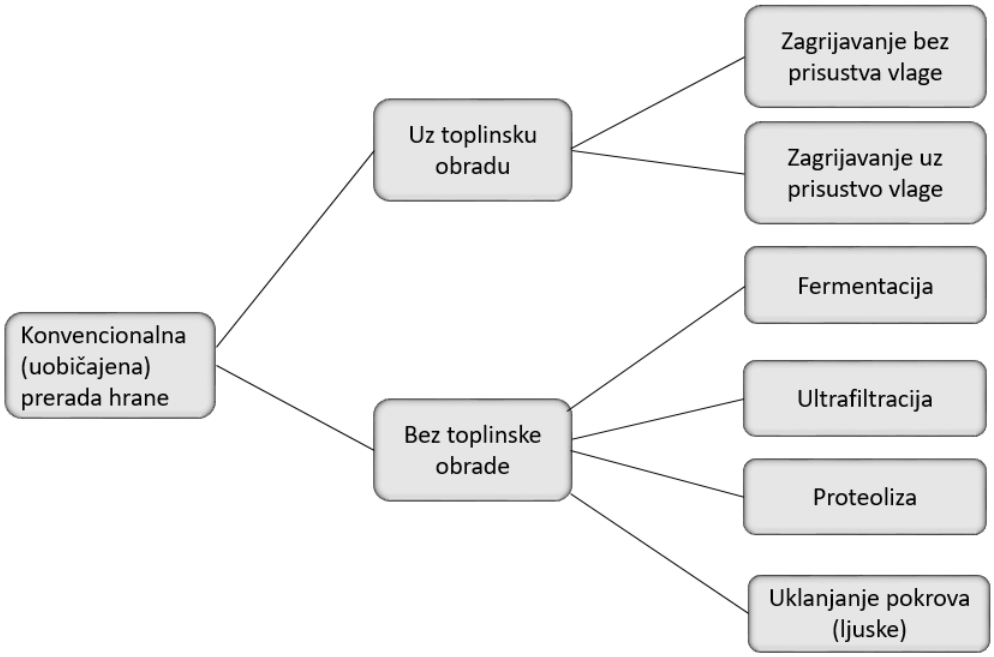
izmijeniti alergijski potencijal (Paschke, 2009). Do koje mjere su proteini modificirani tijekom prerade hrane ovisi o uvjetima prerade, prirodi proteina i sastavu hrane. Nakon obrade hrane aktivnost alergena složene namirnice može ostati jednaka, a moguće ju je i smanjiti ili povećati. Različiti postupci obrade koji su rezultirali smanjenjem IgE reaktivnosti alergena voća prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Različiti postupci obrade koji su rezultirali smanjenjem IgE reaktivnosti alergena voća

Voće	**Alergen**	**Obrada**	**Literaturni navod**
Jabuka	Mal d 1	Visoki hidrostatski tlak (HPP)	Meyer-Pittroff i sur., 2007; Johnson i sur., 2010
	Mal d 3	Toplinska obrada (TO) (>90 ˚C) + glukoza	Sancho i sur., 2005
		HPP + TO (118 ˚C, 700 MPa)	Husband i sur., 2011
Kivi	Act d 1	TO (95 ˚C) uz pH 3	Bublin i sur.,2008
Breskva	Pru p 1	Guljenje lužinom	Brenna i sur., 2000
	Pru p 3	TO (95 ˚C) uz neutralan pH	Gaier i sur., 2008
Marelica	Pru ar 3	Kemijsko guljenje	Brenna i sur.,2005
Trešnja	Pru av 3	Enzimsko posmeđivanje	Scheurer i sur., 2004
Mango	Man i 1 & Ma i 2	Enzimska obrada + guljenje	Dube i sur., 2004
Celer	Api g 1	TO	Ganglberger i sur., 2000

Nove metode obrade hrane pokazale su određene prednosti u odnosu na konvencionalne u smislu manjih troškova i uštede energije te dobivanja kvalitetnog konačnog proizvoda (očuvanje ili čak i poboljšanje karakterističnih svojstava proizvoda - organoleptičkih i nutritivnih značajki u usporedbi sa konvencionalnim metodama) (Vanga i sur., 2017).

Konvencionalne metode obrade hrane dijele se na **toplinske i netoplinske metode,** a njihova podjela prikazana je na Slici 8. Vrlo često, prilikom proizvodnje hrane koristi se kombinacija i toplinskih i netoplinskih metoda obrade (npr. konzervirano voće i povrće) (Sathe i Sharma, 2009).



Slika 8. Podjela konvencionalnih metoda obrade hrane (preuzeto i prilagođeno iz Vanga i sur., 2017)

Dakle, obrada hrane uključuje brojne promjene (fizikalnih, kemijskih, biokemijskih) različitih sastojaka hrane uključujući i promjene na proteinima zbog kojih i može doći do promjene u alergenosti specifičnih epitopa proteina (Tablica 6.). Ovisno o vrsti primijenjene obrade epitopi prisutni u sastavu hrane mogu biti uništeni ili se mogu formirati novi epitopi koji se nazivaju „neoalergeni“ (Vanga i sur., 2017; Thomas i sur.; 2007 ; Sathe i sur., 2005).

Spies i suradnici su 1974. prvi naveli neoalergene kao moguće uzroke alergijske reakcije kod pacijenata koji su konzumirali obrađenu hranu, dok je nakon konzumacije iste, ali neprerađene hrane alergijska reakcija izostala. Osim nastajanja neoalergena, obradom hrane moguće je i povećati alergijski potencijal nekih proteina, ali isto tako on može ostati i nepromijenjen. Zbog velikog broja različitih načina obrade hrane, važno je znati njihov utjecaj na specifične epitope (konformacijski i linearni epitopi) kako bi se mogao analizirati utjecaj na alergijski potencijal određenih proteina (Vanga i sur., 2017). Epitop je dio antigena kojega prepoznaje protutijelo ili antigenski receptor limfocita. Složeni

proteinski antigeni imaju više desetaka linearnih (sekvencijskih) epitopa ili konformacijskih (diskontinuiranih) epitopa. Konformacijski epitop čine aminokiselinski ostaci koji su smješteni na različitim dijelovima polipeptidnog lanca, a u interakciju s paratopima (dio protutijela koji prepoznaje antigen, koji ga veže za protutijelo) stupaju na osnovu trodimenzijske strukture. Nasuprot tome, linearni epitop se formira kontinuiranim slijedom aminokiselina u antigenu te reagira s paratopima na osnovu svoje primarne strukture.

2.10.1. Konvencionalni postupci obrade hrane

2.10.1.1. Toplinski postupci

Toplinski postupci prvenstveno se provode zbog osiguranja mikrobiološke sigurnosti hrane, poboljšanja teksture, okusa, boje, mirisa i probavljivosti hrane. Toplinski postupci obrade hrane se dijele na dva tipa obrade: **toplinska obrada u vlažnoj sredini** (kuhanje, prženje, ekstruzija, autoklaviranje) i **toplinska obrada u suhoj sredini** (pečenje, prženje, obrada mikrovalovima, sušenje) (Shriver i Yang, 2011).

Prilikom toplinske obrade, konformacijski epitopi odgovorni za alergenost uglavnom se uništavaju, dok linearni epitopi mogu biti očuvani, a drugi, pak, skriveni u izvornoj konformaciji mogu biti otkriveni. Nadalje, toplinska obrada može stvoriti nove imunosno reaktivne strukture (neoalergene), među kojima su i krajnji proizvodi uznapredovale glikacije nastali uslijed Maillard-ove reakcije amino skupina proteina sa šećerima (Mills i sur., 2009).

Promjena konformacije proteina može promijeniti epitope koji tada neće biti prepoznati od strane IgE protutijela ili neće pobuditi imunosni odgovor. U nekim slučajevima pokazalo se da toplinska obrada smanjuje alergijski potencijal, dok se, naprotiv, u nekim slučajevima nakon toplinske obrade alergijski potencijal povećao, vjerojatno uslijed izlaganja (otkrivanja) novih mjesta vezanja za IgE protutijela (Shriver i Yang, 2011; Besler i sur., 2001).

S obzirom na različite strukture alergena u cjelovitoj namirnici i imajući na umu da isti postupak obrade može različito djelovati na različite proteine, teško je predvidjeti utjecaj prerade hrane na strukturna i alergena svojstva alergena iz hrane (Mills i sur., 2009). Također, utjecaj prerade na IgE-vezujući kapacitet alergena ne predviđa nužno alergenost modificirane namirnice u populaciji pacijenata alergičara. Za izazivanje alergijskih reakcija vrlo je važna i

uloga samog matriksa hrane, pa tako matriks bogat masnoćama može utjecati na kinetiku otpuštanja alergena pojačavajući intenzitet alergijskih reakcija (Mills i sur., 2009). Alergijski potencijal netopljivih proteinskih kompleksa je i dalje nedovoljno istražen unatoč činjenici da predstavljaju većinu proteina koji se konzumiraju (Mills i sur., 2009).

Toplinska obrada u vlažnoj sredini

Toplinska obrada hrane u vlažnim uvjetima podrazumijeva obradu hrane pri povišenim temperaturama u prisutnosti vode. U literaturi se može naći nekoliko primjera promjene konformacijske strukture epitopa proteina nakon kuhanja u vlažnoj sredini. U Tablici 7 navedene su neke namirnice u kojima se nakon obrade u vlažnoj sredini alergijski potencijal smanjio odnosno povećao.

Tablica 7. Promjena alergijskog potencijala namirnice nakon obrade u vlažnoj sredini (Shriver i Yang, 2011)

Vrsta namirnice	**Alergeni u namirnici**	**Promjene u alergijskom potencijalu**
Kikiriki	Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3	smanjenje
Škampi	tropomiozin	samo tropomiozin povećan , smanjenje cijelog potencijala
Riba	parvalbumin	parvalbumin nepromijenjen (90ºC) ili smanjen (pregrijavanje)
Mlijeko	kazein, protein sirutke, β-laktoalbumin	kazein nepromijenjen, protein sirutke smanjen, ß-laktoalbumin smanjen
Jaje	ovomukoid i ovalbumin	nepromijenjeni

Poznato je da primjerice salata, mrkva, rajčica i tikvice mogu uzrokovati alergijske reakcije u osjetljivih pacijenata. Međutim, neki znanstvenici sugeriraju kako se kuhanjem smanjuje reaktivnost, iako su za potvrdu toga potrebna daljnja istraživanja. Iako krumpir također ima određeni alergijski potencijal, on može biti dobar primjer hrane koja se najčešće konzumira kuhana te su stoga alergije povezane s ovim povrćem jako rijetke (Fiocchi i sur. 2004). Smanjenje alergijskog potencijala kikirikija kuhanjem dokazali su Beyer i suradnici (2001) te Mondoulet i suradnici (2005). Zaključili su da je do smanjenja alergijskog potencijala došlo zbog smanjenja količine prisutnih alergena koji su se isprali tijekom kuhanja. Osim primjera navedenih u Tablici 6, obrada u vlažnoj sredini dovela je i do promjena konformacijske strukture proteina u plodovima trešnje te proteina jabuke (Mal d 2) (Andreas, 2009). Zanimljivo je da alergen celera, Api g, obradom u vlažnoj sredini zadržava svoju alergenost zbog zadržavanja većine nativne strukture molekule (Andreas, 2009) kao i alergen soje (Gly m 4) (Kleine-Tebbe i sur. 2002) (Vanga i sur, 2017).

Toplinska obrada u suhim uvjetima

Pečenje, prženje, priprema hrane mikrovalovima te sušenje su postupci pripreme hrane koji se odvijaju u suhoj sredini i podrazumijevaju minimalnu interakciju hrane s vodom. Prilikom navedenih toplinskih obrada, vrlo često dolazi do reakcija neenzimskog posmeđivanja odnosno Maillardovih reakcija. U Maillardovim reakcijama reducirajući šećeri reagiraju s funkcionalnim grupama aminokiselina što dovodi do nastanka brojnih spojeva koji doprinose mirisu, boji i aromi pripremljene hrane. Događaju se pri visokim temperaturama, iznad 120 °C, koje se upravo postižu prilikom prženja i pečenja. Nastali spojevi mogu promijeniti reaktivnost alergena ili probavljivost alergenog sastojka ili epitopa (Vanga i sur., 2017; Thomas i sur., 2007) prikazanih u Tablici 8.

Tablica 8. Promjena alergijskog potencijala namirnice nakon obrade u suhoj sredini (Shriver i Yang, 2011)

Vrsta namirnice	**Alergeni u namirnici**	**Promjene u alergijskom potencijalu**
Kikiriki	Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3	povećan
Pšenica	gliadin	povećan
Pšenični kruh	gliadin	povećan
Pšenično tijesto	gliadin	nepromijenjen
Bademi	amandin	nepromijenjen
Lješnjaci	Cor a 1, Cor a 2	smanjen
Jaje	ovomukoid, ovalbumin	smanjen

Struktura proteina uvelike utječe na njegovu stabilnost. Pečenje (npr. pri 140 °C, u trajanju od 40 minuta) smanjuje alergenost glavnog alergena lješnjaka Cor a 1.04 i samog lješnjaka za otprilike 100 puta (Hansen i sur., 2003). Za razliku od kuhanja, prilikom kojeg se alergijski potencijal kikirikija smanjuje, prženje ga povećava, što su u svom istraživanju i dokazali Maleki i suradnici (2000). Rezultati njihova istraživanja pokazali su povećanje kapaciteta vezanja alergena Ara h 1 i Ara h 2 na imunoglobulin E za otprilike 90 puta u odnosu na sirovi proteinski ekstrakt. Povećanje alergenosti kikirikija prilikom prženja pripisali su Maillardovim reakcijama. Utjecaj prženja na alergenost kikirikija istraživali su i Nordlee i suradnici (1981) koji su zaključili da se ona povećava i kod suho prženog kikirikija, i kod kikirikija prženog u ulju. Suho prženje brašna indijskih oraščića pri različitim temperaturama (140 °C, 175 °C i 200 °C) kroz različito vrijeme (između 10 min i 30 min) nije

pokazalo utjecaj na promjenu prisutnih alergenih komponenti (Vanga i sur., 2017; Venkatachalam i sur., 2008).

2.10.1.2. Netoplinski postupci

Netoplinski postupci obrade hrane uključuju različite mehaničke postupke kao što su dezintegracija tkiva, guljenje, homogenizacija i slično. Nekoliko postupaka koji se najčešće koriste su proteoliza ili hidroliza, ultrafiltracija i fermentacija (Thomas i sur., 2007, Vanga i sur., 2017). Navedeni postupci su značajni jer mogu promijeniti konformaciju proteina, a time i alergenost određenih namirnica (Vanga i sur., 2017).

Enzimska hidroliza ubraja se u najčešće postupke industrijske obrade s ciljem smanjenja alergenosti proteina (Akiyama i sur., 2006). Proteoliza ili hidroliza je reakcija u kojoj dolazi do kidanja peptidnih veza u primarnoj strukturi proteina između različitih amino kiselina (Vanga i sur., 2017). Vrsta i stupanj hidrolize ovise o primarnoj strukturi proteina, ali i o njegovoj sekundarnoj/tercijarnoj strukturi te o posttranslacijskim modifikacijama (npr. glikozilacija). Štoviše, proteolizom je moguće uništiti određene epitope, ali isto tako i otkriti linearne epitope koji su bili skriveni u izvornoj trodimenzijskoj strukturi i/ili smješteni u hidrofobnoj domeni proteina, koji time postaju dostupni za vezanje protutijela IgE. Neki su peptidi dobiveni parcijalnom hidrolizom i dalje alergeni, jer sadrže epitope i/ili mogu tvoriti alergene agregate. Utvrđeno je da prilikom *in vitro* hidrolize proteina kikirikija dolazi do značajne promjene sekundarne strukture alergena Ara h 2, ali ta promjena ne utječe na smanjenje alergenosti Ara h 2 zbog zadržavanja linearnog epitopa u strukturi nakon hidrolize (Sathe i sur., 2005). Rezultati nekoliko istraživanja pokazali su da hidroliza smanjuje kapacitet vezanja IgE za neke proteine kikirikija. Prema Chung i suradnicima (2004) i Yu i suradnicima (2011) peroksidaze ili probavni enzimi (α-kimotripsin i tripsin) hidroliziraju i reduciraju Ara h 1 i Ara h2 u prženom, ali ne i u sirovom kikirikiju. Yu i suradnici (2011) također su utvrdili da prethodno blanširanje (5 min) prije hidrolize poboljšava učinak enzimske hidrolize u prženom kikirikiju. Hildebrandt i suradnici (2008) dokazali su da postupak enzimske hidrolize u kombinaciji s toplinskim postupcima može smanjiti kapacitet vezanja IgE za proteine jaja više od 100 puta.

Fermentacija je jedan od najstarijih postupaka konzerviranja u kojem sudjeluju mikrobni organizmi. Vrlo često se koristi upravo zbog mogućnosti proizvodnje velikog broja proizvoda od žitarica, leguminoza, mlijeka i mesa, namirnica koje sadrže visok udio proteina

(Vanga i sur., 2017). Neke su analize pokazale da su promjene na proteinima prilikom fermentacije minimalne (McFeeters, 1988). U slučaju mlijeka, β-laktoglobulin i kazein, smatraju se potencijalnim alergenima. Kod fermentiranog mlijeka i jogurta, uočen je smanjeni kapacitet za vezanje IgE (Ehn i sur., 2004). Kod pasteriziranih proizvoda, protein je parcijalno hidroliziran enzimskom aktivnošću starter kulture kojom je moguće uništiti određene epitope. Fermentacija obranog mlijeka bakterijama mliječne kiseline (*Lactobacillus helveticus* i *Streptococcus thermophilus*) smanjuje kapacitet za vezanje IgE α-laktalbumina i β-laktoglobulina (Bu i sur., 2010).

2.10.2. Novi postupci obrade

Novi postupci obrade hrane, kao i oni konvencionalni, mogu se podijeliti na toplinske i ne-toplinske postupke. U toplinske postupke obrade se ubrajaju postupci kao što je dielektrično zagrijavanje (mikrovalovi, radiovalovi) i omsko zagrijavanje. U netoplinske postupke obrade ubrajaju se obrada visokim hidrostatskim tlakom, gama-zračenjem, pulsirajućim električnim poljem, ultrazvukom visokih intenziteta te obrada ultraljubičastom svjetlošću (Vanga i sur., 2017).

2.10.2.1. Toplinski postupci

Obrada hrane pri povišenim temperaturama primjenom nove tehnologije postala je nedavno vrlo popularna, kako zbog nižih troškova proizvodnje, tako i bolje kvalitete gotovog proizvoda u odnosu na konvencionalne postupke pri povišenim temperaturama. Utjecaj ovih tehnika na alergenost obrađenih namirnica nije znatno istraživana, osim u slučaju obrade mikrovalovima.

Kod obrade hrane mikrovalovima dolazi do brzog stvaranja topline, a količina stvorene topline ovisi o sastavu i homogenosti hrane. Brzina prijenosa topline unutar hrane ovisi o kemijskom sastavu hrane (posebice o prisutnosti vode), kao i o obliku hrane.

Neke od promjena koje se događaju na hrani tijekom mikrovalne obrade zbog stvaranja visokih temperatura u hrani su: izlazak (stvaranje) vodene pare (pečenje), želatinizacija škroba (krumpir, kukuruz), denaturacija proteina (mlijeko, jaja), površinsko posmeđivanje (Maillardove reakcije kod pečenja), karamelizacija i inaktivacija enzima (Vanga i sur., 2017). Navedene promjene utječu na strukturna i organoleptička svojstva hrane. Upravo zbog

mogućnosti denaturacije proteina, istraživan je i utjecaj obrade mikrovalovima na alergijski potencijal nekih namirnica.

Rezultati istraživanja Zellal i suradnika (2011) pokazali su da se alergijski potencijal β-laktoglobulina značajno smanjio nakon obrade mikrovalovima (snaga mikrovalova 300 W i 700 W) pri pH 4,6 i 6,8. Utjecaj obrade mikrovalovima na smanjenje alergijskog potencijala lješnjaka (Wigotzki i sur., 2000) i badema bio je minimalan (Venkatachalam i sur., 2002). Jankiewicz i suradnici (1997) istraživali su utjecaj obrade mikrovalovima snage od 700 W i 750 W kroz 10 minuta pri 100 °C na alergijski potencijal celera, a prema dobivenim rezultatima zaključili su da primijenjeni postupak pri odabranim uvjetima utječe na njegovo smanjenje.

2.10.2.2. Netoplinski postupci

Često toplinski postupci zbog obrade hrane pri visokim temperaturama dovode i do neželjenih promjena u kvaliteti hrane (senzorska i nutritivna svojstva). Upravo zbog toga istražuju se inovativni, netoplinski postupci obrade hrane, a najčešće istraživani su obrada visokim hidrostatskim tlakom, gama zračenje, pulsirajuće ultraljubičasto svjetlo, ultrazvuk visokog intenziteta i obrada hladnom plazmom.

Visoki hidrostatski tlak se u prehrambenoj industriji prvenstveno koristi s ciljem inaktivacije mikroorganizama i prisutnih enzima, kao i za poboljšanje teksture proizvoda upravo zbog promjene na proteinima i njihove denaturacije. Zbog činjenice da je primijenjeni tlak jednako raspoređen unutar komore za obradu, omogućena je homogena obrada cijele namirnice bez obzira na veličinu ili oblik proizvoda. Upravo konformacijske promjene na proteinima potaknule su istraživanja o mogućim promjenama alergijskog potencijala namirnica nakon obrade visokim tlakom. Utjecaj visokog tlaka na alergijski potencijal namirnica ovisi o strukturi proteina u namirnici koja se obrađuje, primijenjenom tlaku (općenito 100-400 MPa), temperaturi i duljini trajanja obrade.

Brojna su istraživanja provedena o djelovanju visokog tlaka na alergijski potencijal obrađenih namirnica. Kato i suradnici (2000) obradili su zrna riže tlakom od 300 MPa (120 min) i time reducirali prisutne alergene riže. Smanjenje alergijskog potencijala nakon obrade visokim tlakom primijetili su i Penas i suradnici (2011) u zrnima soje. Oni su primjenom tlaka od 100-300 MPa u vremenu od 15 min reducirali alergijski potencijal alergena soje Gly m 1. Li i suradnici (2012) uočili su da visoki hidrostatski tlak ima značajan učinak na sekundarnu

strukturu alergena soje. Visoki hidrostatski tlak nije smanjio alergijski potencijal obrađenih badema (Li i sur., 2013), a nije došlo ni do promjena alergijskog potencijala alergena jabuke Mal d 1 nakon obrade soka jabuke (450-550 MPa u vremenu 3-10 min.) (Houska i sur., 2009). Heroldova i suradnici (2009) istraživali su učinak visokog tlaka (400–550 MPa) pri povišenim temperaturama (30 °C, 40 °C i 50 °C) tijekom 3-10 min. na sok od mrkve. Utvrdili su da nije bilo promjene u imunoreaktivnosti pri navedenim uvjetima obrade. Prema Vangi i suradnicima (2017) utjecaj obrade visokim hidrostatskim tlakom na smanjenje alergijskog potencijala namirnica je u većoj mjeri izražen ukoliko se provodi u kombinaciji s nekim drugim postupkom, npr. toplinskom obradom ili proteolizom.

Ultrazvuk visokih intenziteta (niska frekvencija, visoka snaga) uspješno se koristi u prehrambenoj industriji s ciljem poboljšanja procesa/proizvoda. Neki od procesa u kojima se ultrazvuk često upotrebljava su postupci soljenja (salamurenja), maceracije, inaktivacije mikroorganizama i enzima, smrzavanja, modifikacije sastojaka, ekstrakcije, pripreme emulzija i dr. (Esclapez i sur., 2011; Marić i sur., 2018). Ultrazvuk visokog intenziteta stvara mehaničke valove pri frekvencijama od 20-100 kHz. Njihovim prolaskom kroz hranu stvaraju se mjesta sažimanja i razrjeđenja čestica medija, pri čemu zbog stvaranja negativnih i pozitivnih tlakova nastaju kavitacijski mjehurići koji se, kad postignu kritični volumen, naglo urušavaju. Prilikom implozije mjehurića u njegovoj se blizini postižu temperature od 5000 K i tlak od 1000 atmosfera. Takvi ekstremni uvjeti mogu izazvati fizičke promjene u konformaciji alergena i time promijeniti njegovu reaktivnost. Siloviti raspad mjehurića uzrokuje nastajanje mikrostrujanja, mikromlazova i udarnih valova, što rezultira turbulentnim kretanjem medija.

Visoke temperature i tlak koji istovremeno nastaju na mjestu raspada mjehurića uzrokuju brojne kemijske promjene (nastajanje slobodnih radikala) koji također mogu utjecati na modifikaciju proteina i ostalih sastojaka hrane (Soria i Villamel, 2010).

Do sada je vrlo malo podataka objavljeno o utjecaju ultrazvuka visokih intenziteta na alergene. Rezultati istraživanja koje su proveli Li i suradnici (2006) pokazali su da obrada škampa (izolirani tropomiozin i sirovi proteinski ekstrakt škampa) ultrazvukom visokog intenziteta smanjuje IgE vezujući kapacitet. U istraživanju djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta na promjenu alergenosti β-laktoglobulina iz mlijeka, Stanić-Vučinić i suradnici (2012) zaključili su da unatoč značajnim konformacijskim promjenama u strukturi proteina i alergena izazvanima djelovanjem ultrazvuka nije došlo do značajne promjene u alergijskom

potencijalu mlijeka. Do istog su zaključka došli i Tammineedi i suradnici (2013) nakon obrade proteina sirutke i kazeina.

Pri obradi hrane gama zračenjem hrana se izlaže djelovanju ionizirajućeg zračenja, a najčešći izvori zračenja su izotopi Kobalt-60 i Cezij-137. U prehrambenoj industriji se gama zračenje primarno koristi za produljenje roka trajanja hrane (smanjenje broja patogenih mikroorganizama) (Vanga i sur., 2017). Doze gama zračenja za primjenu u prehrambenoj industriji su do 10 kGy (Shriver i Yang, 2011). Srednje doze gama zračenja (2-7 kGy) eliminiraju patogene na površini hrane bez utjecaja na organoloeptičke i nutritivne značajke proizvoda (Farkas, 1998). Istraživana je i potencijalna uporaba gama zračenja u reduciranju alergenog potencijala različitih namirnica zbog pretpostavke da zračenje može utjecati na konformacijske promjene u strukturi proteina. Li i suradnici (2007) istraživali su utjecaj zračenja (1-15 kGy) u kombinaciji s povišenom temperaturom (100°C) na alergijski potencijal škampa. Rezultati su pokazali da takav način obrade smanjuje kapacitet vezanja alergena škampa na IgE od 5 do 30 puta. Pojedinačno primijenjeni postupci, samo zračenje i povišena temperatura, nisu uzrokovali značajno smanjenje alergijskog potencijala. Slično istraživanje proveli su i Kasera i suradnici (2012) u kojem su utvrdili da kuhanje u kombinaciji sa zračenjem (25 kGy) reducira topljivost i alergijski potencijal proteina leguminoza. Byun i suradnici (2000) primijenili su gama zračenje (0-10 kGy) na ekstrahirane, termostabilne proteine smeđih škampa i utvrdili smanjenje alergijskog potencijala.

Smanjenje alergijskog potencijala primijetili su i Luo i suradnici (2013) nakon zračenja (10 kGy) izoliranog alergena kikirikija Ara h6 i proteinskog ekstrakta kikirikija. Nasuprot tome, Su i suradnici (2004) zračili su bademe, indijske oraščiće i orahe gama zračenjem (1-25 kGy) sa ili bez toplinske obrade (autoklaviranje, blanširanje, prženje, mikrovalna obrada, pečenje) te utvrdili da su prisutni alergeni bili stabilni u gotovo svim uvjetima obrade.

Izlaganje namirnica gama zračenju može ubrzavati umrežavanje, odmotavanje i fragmentaciju proteina što posljedično izaziva promjene u strukturi proteina. Promjene na proteinima uzrokovane su direktno fotonima ili indirektno nastalim reaktivnim kisikovim vrstama (engl. reactive oxygen species, ROS). Nastale promjene na proteinima utječu na promjene alergijskog potencijala ovisno o primijenjenoj dozi zračenja, koncentraciji proteina, prisutnosti kisika i molekularnoj strukturi (Chizoba Ekezie i sur., 2018).

Pulsirajuće ultraljubičasto zračenje u prehrambenoj industriji primjenjuje se kao kontinuirani proces ili proces s pulsevima. Pulsirajuće ultraljubičasto zračenje može biti i do nekoliko

tisuća puta intenzivnije nego konvencionalna, kontinuirano UV zračenje (Shriver i Yang, 2011). Pulsirajuće ultraljubičasto zračenje nastaje tako što se električna energija uskladištena na kondenzatoru otpušta u pulsevima koji prolaze kroz lampu koja je ispunjena inertnim plinom (ksenon). Na taj se način plin ionizira i emitira zračenje u obliku ultraljubičastog (54 %), vidljivog (26 %) i infracrvenog zračenja (20 %). Smatra se da pulsirajuće ultraljubičasto zračenje ima fototermički, fotofizički i fotokemijski učinak na hranu, koji mogu promijeniti konformaciju alergena ili izazvati agregaciju proteina što rezultira promjenom konformacijskih epitopa. Inače, pulsirajuće ultraljubičasto zračenje koristi se u postupcima sterilizacije, dok se u novije vrijeme istražuje i njegova potencijalna uporaba za smanjenje alergijskog potencijala namirnica (kikiriki, proizvodi od soje, škampi, jaja, mlijeko i drugi) (Shriver i Yang, 2011). Li i suradnici (2013) proučavali su utjecaj pulsirajućeg ultraljubičastog zračenja na alergijski potencijal proteinskog ekstrakta badema i utvrdili da je tretman zračenjem (0,5-10 minuta) u većoj mjeri smanjio kapacitet vezanja proteina badema na IgE protutijelo nego kontrolni proces termičke obrade (kuhanje). Pulsirajućim ultraljubičastim zračenjem može se smanjiti i kapacitet vezanja proteina kikirikija (ekstrakt kikirikija, maslac od kikirikija) na IgE (Chung i sur., 2008), a slično istraživanje proveli su i Yang i suradnici (2012), koji su također utvrdili smanjenje alergijskog potencijala glavnih alergena kikirikija (Ara h 1, Ara h 2 i Ara h 3). Pulsirajućim ultraljubičastim zračenjem kroz 6 minuta smanjen je alergijski potencijal soje (Yang i sur., 2010) i mlijeka (Anugu, 2009), dok je alergijski potencijal bjelanjka jajeta nakon obrade ostao nepromijenjen (Manzocco i sur., 2012). Iako većina radova ukazuje na mogućnost smanjenja alergijskog potencijala primjenom pulsirajućeg ultraljubičastog zračenja, potrebna su daljnja klinička i *in vivo* istraživanja kako bi se ova tehnologija mogla primjenjivati u masovnoj proizvodnji.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

glicerol *(Sigma-Aldrich, St Louis, SAD)*
glicin *(Sigma-Aldrich, St. Louis)*
izopropanol *(Sigma-Aldrich, St. Louis)*
ledena octena kiselina *(Kemika, Zagreb, Hrvatska)*
limunska kiselina (*Sigma-Aldrich, St. Louis*)
2- merkaptoetanol *(Sigma-Aldrich, St. Louis)*
metanol *(Sigma-Aldrich, St. Louis)*
dinatrijev-hidrogen fosfat, Na_2HPO_4 (*Sigma-Aldrich, St. Louis*)
natrijev hidrogen karbonat, $NaHCO_3$ (*Sigma-Aldrich, St. Louis*)
natrijev hidroksid, NaOH (*Sigma-Aldrich, St. Louis*)
natrijev karbonat, Na_2CO_3 (*Sigma-Aldrich, St. Louis*)
natrijev klorid, NaCl *(Sigma-Aldrich, St. Louis)*
o-fenilendiamin dihidroklorid (OPD) tablete (*Thermo Scientific*)
PBS tablete (*Calbiochem*)
SDS, natrijev dodecil sulfat *(Sigma-Aldrich, St. Louis)*
sulfatna kiselina, H_2SO_4 *(Sigma-Aldrich, St. Louis)*
Tris, tris[hidroksimetil]aminometan - Trizma base® *(Sigma-Aldrich, St. Louis)*
Tween® 20 (*Sigma-Aldrich, St. Louis*)
vodikov peroksid, H_2O_2 (30% otopina, *Sigma-Aldrich, St. Louis*)

3.1.2. Boje

Coomassie Brilliant Blue® R-250 (*Sigma-Aldrich, St. Louis*)

3.1.3. Protutijela i drugi proteini

kozje IgG protutijelo razvijeno naspram molekule humanog IgE, obilježeno peroksidazom iz hrena (*Sigma-Aldrich, St. Louis*)
BSA, albumin goveđeg seruma *(Sigma-Aldrich, St. Louis)*
standard molekulskih masa Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard (*Invitrogen*)
standard molekulskih masa Color Prestained Protein Standard, Broad Range (*New England Biolabs*)
BIO-RAD Protein Assay (*Biorad, Milano, Italija*)
proteinski ekstrakt gomolja komorača (*Foeniculum vulgare*, Apiaceae)
proteinski ekstrakt kore i pulpe patlidžana (*Solanum melongena*, Solanaceae; cultivar orient express)
proteinski ekstrakt kore i pulpe jabuke (*Malus domestica*, Rosaceae; cultivar Annurca)

3.1.4. Gelovi za elektroforezu i membrane za imunodetekciju

Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (*Biorad*)
Immobilon® PVDF membrana (*Sigma-Aldrich, St. Louis*)

3.1.5. Specifične komercijalne smjese analitičkih reagencija – kompleti

Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (*GE Healthcare Life Sciences*)

3.1.6. Serumi ispitanika

3 seruma osoba alergičnih na komorač, patlidžan i jabuku
1 kontrolni serum (serum osobe koja nije alergična)

4. METODE RADA

4.1. Laboratorijsko - dijagnostički test – FABER test

FABER test predstavlja dijagnostički alat za laboratorijsko ispitivanje alergijskih bolesti, a razvijen je koristeći se suvremenom nanotehnologijom (Tuppo i sur., 2018). FABER test koristi molekularne alergene i alergene ekstrakte spojene na nano-kuglice pomoću različitih spojeva, čime se postiže optimiziranje konjugacije alergijskih proteina. FABER test 244-122-122, razvijen je korištenjem 122 molekularna alergena i 122 alergijska ekstrakta. Ukupno, 122 različita alergena izvora (npr. pelud, grinje, epitel, plijesni, hrana biljnog i životinjskog podrijetla) koji potječu iz 22 različita izvora (npr. mlijeko, jaja, voće, sjeme, otrovi i dr.), integrirani su u jedan jedinstven test.

Alergeni koji su konjugirani na nano-kuglice raspoređuju na čvrstu površinu za sljedeće testiranje. Prije imobilizacije na biočipu FABER testa, svaki pripravak alergena povezuje se s kemijski aktiviranim nano-zrncima. FABER biočip upotrebljava se za postupak ispitivanja sličan ELISA-i, a konačni signal za svaki alergen dobiva se korištenjem optičkog skenera i razrađuje namjenski softver. Signali odgovarajućeg intenziteta koriste se za izračunavanje proizvoljnih jedinica, FIU (od engl. FABER internatiounal units), u korelaciji s razinom IgE vezanom za svako mjesto alergena. FABER test se izvodi korištenjem 120 μL seruma. Rezultati mjerenja specifičnog IgE-a prikazuju se prema reaktivnosti (negativan nalaz, niska, umjerena, visoka ili jako visoka razina senzibilizacije). Pozitivni nalaz ukazuje na prisutnost IgE-a specifičnog za alergen u serumu odnosno da je osoba senzibilizirana na ispitivani alergen. Pozitivan specifični IgE test uz pozitivnu anamnezu dokaz je klinički relevantne senzibilizacije na testirani alergen. Na temelju medicinskih podataka, FABER alergološki test omogućuje donošenje odluka o medicinskoj intervenciji: izbjegavanje kontakta s alergenom, terapiji lijekovima, imunoterapiji (alergena cjepiva).

Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Etičko povjerenstvo Poliklinike Analiza dali su potvrdu da se mogu koristiti rezultati arhiviranih dijagnostičkih FABER testova. U ovo istraživanje uključeno je 111 arhiviranih dijagnostičkih testova. Od ukupnog broja pacijenata, odabrani su serumi osoba na osnovu rezultata mjerenja visokih vrijednosti specifičnog IgE-a (≥0,30 FIU/mL) za komorač, patlidžan i jabuku. Odabrani pacijenti su uključeni u istraživanje na osnovu odobrenja etičkih povjerenstava i potpisivanjem informiranog pristanka za sudjelovanje u istraživanju, zbog

povjerljivosti i zaštite osobnih podataka. Vađenje krvi (15 mL) provodilo se jednokratno i dobiven je krvni serum u kojemu se nalaze IgE protutijela s kojim su provedena daljnja ispitivanja. Ovo istraživanje nije uključivalo nikakav rizik, osim uobičajenog svakodnevnog rizika vađenja krvi. Sudjelovanje u ovome istraživanju bilo je u potpunosti dobrovoljno.

4.2. Obrada rezultata dijagnostičkih testova

4.2.1. Statistička analiza

U obradi podataka retrospektivnog istraživanja korišteni su programski paketi Statistica v.8. XLStat te IBM SPSS Statistics v 25. Primijenjena je deskriptivna statistika za opis karakteristika i mjernih varijabli pojedinih ispitivanih podskupina i za njihov prikaz u obliku tablica. Za opis kontinuiranih varijabli, kao mjera središnje tendencije i varijabilnosti, korišteni su prosjek i standardna devijacija u slučajevima normalne razdiobe (distribucije) ili medijan i interkvartilni raspon u slučajevima kada je razdioba odstupala od normalne. Kategorijski podaci su prikazani kao apsolutni i relativni broj (postotak), tj. učestalost (%) i 95 %-tni raspon pouzdanosti (CI).

Za usporedbu istih podataka među podskupinama, korištena je analiza varijance (ANOVA), a za usporedbu raspodjele kategorijskih varijabli među skupinama korišten je χ^2 test. S obzirom na to da nema razloga tvrditi da razlika, ukoliko postoji, može biti samo u jednome smjeru, primijenjeni su dvosmjerni testovi koji su se smatrali statistički značajnim ukoliko je $p < 0,05$, što je ujedno i korištena razina značajnosti.

Kako bi se utvrdila povezanost pojedinih varijabli koje su dijelom kategorijske, a dijelom kontinuirane s pripadnošću ispitivanim skupinama, provedena je logistička regresijska analiza i to univarijatno te multivarijatnim modelom.

Multivarijatni model dobiven je na osnovi univarijatne povezanosti pojedinih varijabli. Rezultati logističke regresijske analize korišteni su kako bi se izračunali prediktivni čimbenici za alergiju.

4.2.2. Računanje momenata statističkih skupova

Centralni moment r-tog reda prikazan općom jednadžbom (Gajdoš Kljusurić, 2009) korišten je za izračun momenata od prvog od četvrtog reda (r=1,2,3,4):

$$M_r = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^r \qquad (1)$$

Momenti se nazivaju centralnima jer se koncentriraju oko aritmetičke sredine $\bar{x}$, za koju je r=1.

kada je:

r=1 tad je $\mathbf{M_1=0}$ (aritmetička sredina)

r=2 tad je $\mathbf{M_2=\sigma^2}$ (varijanca)

r=3 tad je $\mathbf{M_3}$ (koeficijent asimetrije)

r=4 tad je $\mathbf{M_4}$ (koeficijent spljoštenosti)

Varijanca predstavlja sumu odstupanja te je prava mjera raspršenja standardna devijacija koja se izračuna kao drugi korijen varijance (Petz, 2007):

$$\sigma = \sqrt{M_2} = \sqrt{\sigma^2} \qquad (2)$$

Momenti koji su u radu korišteni za ocjenu oblika razdiobe su momenti koji opisuju asimetriju su α4 i α4 a računaju se iz momenata asimetrije (M_3) i spljoštenosti (M_4).

$$\alpha_3 = \frac{M_3}{\sigma^3} = \frac{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^3}{\sigma^3} \qquad (3)$$

$$\alpha_4 = \frac{M_4}{\sigma^4} = \frac{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^4}{\sigma^4} \qquad (4)$$

Koeficijent asimetrije (engl. Skewness) predstavlja mjeru nagiba distribucije na lijevo ili desno, dok je koeficijent spljoštenosti (engl. Kurtosis) mjera spljoštenosti (zaobljenosti) distribucije promatranog skupa podataka.

Asimetrija se procjenjuje prema apsolutnoj vrijednosti za treći moment |α3| prema (Tablici 9), a stupanj spljoštenosti (Tablica 10):

Tablica 9. Stupanj asimetrije prema apsolutnoj vrijednosti (Vranić, 1958)

$\|\alpha 3\|$	**Stupanj asimetrije**
0 – 0,1	zanemariva asimetrija
>0,1 – 0,25	slaba asimetrija
0,25 – 0,5	srednja asimetrija
> 0,5	jaka asimetrija

Tablica 10. Stupanj spljoštenosti (Vranić, 1958)

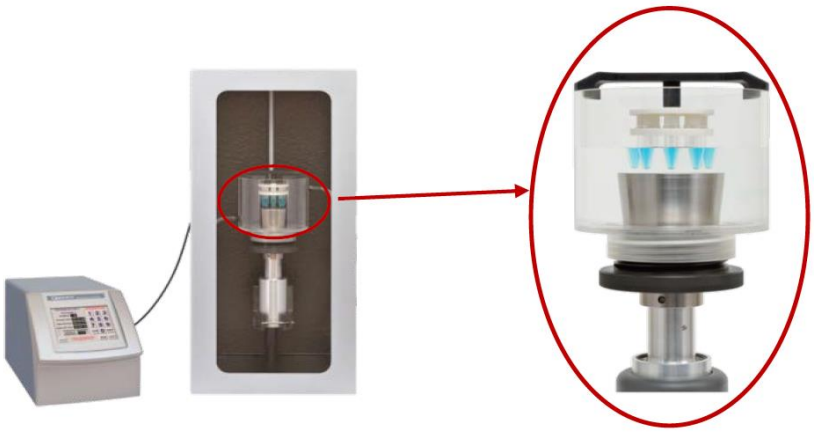
α_4	**Stupanj spljoštenosti**
<3	spljoštenost
=3	normalna spljoštenost
>3	izduženost

4.3. Priprema ekstrakata voća i povrća

Proteinski ekstrakti gomolja komorača, kore i pulpe patlidžana te proteinski ekstrakt kore i pulpe jabuke dobiveni su ljubaznošću prof. dr. sc. Marie Antoniette Ciardiello iz Institute of Biosciences and BioResources (IBBR) - National Research Council iz Italije. Pripremljeni su u laboratoriju prof. Ciardello prema metodi Pasquariello i suradnika (2012) s nekoliko modifikacija. Ukratko, 50 g biljnih tkiva homogenizirano je uz dodatak 25 mL 2 M NaCl, 2 g polivinilpolipirolidona (Sigma, Steinheim, Njemačka), 0,820 mL 0,12 M etilendiamintetraoctene kiseline (Sigma, St. Louis, USA). i 2,2 g L-askorbinske kiseline (Panreac, Barcelona, Španjolska) otopljene u 25 mL vode te je pH vrijednost podešena na 3,5 dodatkom NaOH. Nakon jednog sata uz miješanje u kupelji led-voda, uzorci su centrifugirani na 17.300 g tijekom 45 minuta. Sakupljeno je oko 50 mL supernatanta, koji predstavlja proteinski ekstrakt. Uzorci su zatim dijalizirani prema 2 mM NaCl i koncentrirani ultrafiltracijom na Ultracel 3K Amicon Ultra filterima (Millipore, Carrigtwohill, Irska). Ultrafiltracija je zaustavljena kada se počeo pojavljivati talog na dnu epruvete. Koncentracije proteina određene su spektrofotometrijskom metodom po Bradfordu, a za izradu baždarne krivulje kao standard je korišten goveđi serumski albumin.

4.4. Obrada proteinskih ekstrakata

Proteinski ekstrakti gomolja komorača, kore i pulpe patlidžana te proteinski ekstrakt kore i pulpe jabuke koncentracije 2 mg/mL obrađeni su ultrazvučno i toplinski. Dva načina ultrazvučne obrade primijenjena su za modifikaciju proteinskog ekstrakta. Prvi način obrade proveden je u ultrazvučnoj kupelji (Elmasonic P300H, Elma, Njemačka) s osam ultrazvučnih sondi koje djeluju na uzorke koji se nalaze u kupelji pri frekvenciji od 37 kHz, ukupne snage 380 W i amplitudi 100 %. Drugi način ultrazvučne obrade proveden je pomoću ultrazvučnog procesora (QSONICA, Newtown, SAD, Slika 9) pri frekvenciji od 20 kHz, ukupne snage 700 W i amplitudi 100 %.



Slika 9. Ultrazvučni procesor QSONICA 700 (vlastita fotografija)

U Eppendorf epruvetu od 1,5 mL odvojen je 1 mL ekstrakta proteina i uzorci su obrađeni pri sljedećim uvjetima:
Ultrazvučna kupelj: 60 minuta pri 40 °C;
Ultrazvučni procesor: 15 minuta pri 60 °C;
Toplinska obrada: u vodenoj kupelji pri 95 °C kroz 1 minutu.
Nakon obrade, uzorci su čuvani pri -20 °C.

4.5. SDS-poliakrilamidna gel-elektroforeza (SDS-PAGE)

SDS-PAGE (*engl.* SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) je elektroforetska tehnika za analizu proteina, prvenstveno zahvaljujući sposobnosti SDS-a da u prisutnosti reagensa za razaranje disulfidnih veza, solubilizira, denaturira i disocira većinu proteina u pojedinačne polipeptidne lance.

Uzorci proteina komorača, patlidžana i jabuke (10 μg proteina po jažici) su uz dodatak pufera za nanošenje uzoraka (3xpufer: 0,150 M Tris-Cl; pH 6,8; 2,3 % SDS; 20 % glicerol (v/v); 0,3 M 2-merkaptoetanol; 0,03 % bromfenol plavo u vodi) denaturirani kuhanjem na 95 ^{o}C u trajanju od 3 minute. Proteini su razdvojeni u gradijentnom 8–16 % denaturirajućem poliakrilamidnom gelu (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, Biorad) (Laemmli, 1970.). Da bi se utvrdio položaj vrpci proteina u gelu, gel je obojan bojom Coomassie blue (0,025 % Coomassie Brilliant Blue® R-250, 25 % izopropanol, 10 % octena kiselina) koja specifično boji proteine (Wilson, 1983.). Gel je odbojan otopinom za odbojavanje (10 % octena kiselina). Gel je dokumentiran uređajem Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).

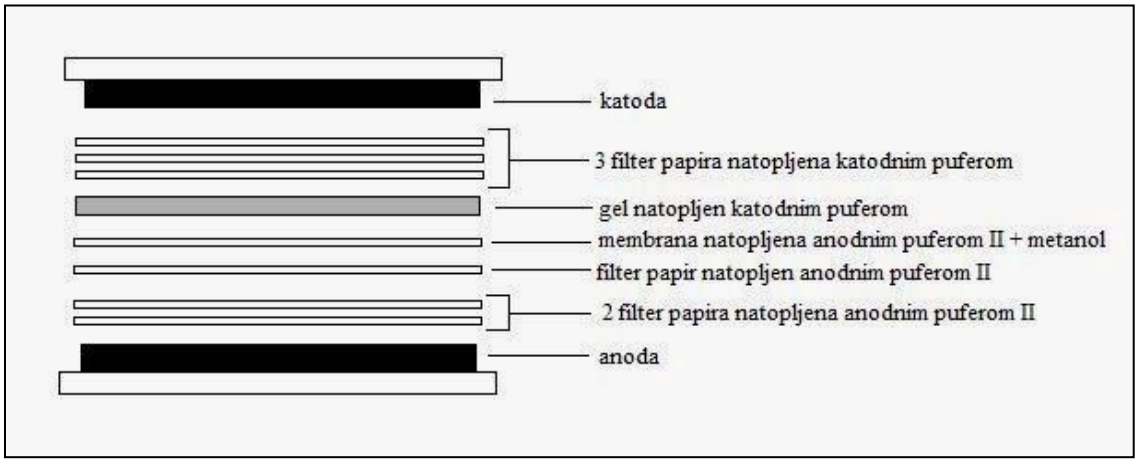
4.6. Određivanje molekulske mase proteina pomoću SDS-PAGE

Budući da proteini pri denaturaciji vežu SDS u približno konstantnom masenom odnosu, rezultirajući SDS-proteinski kompleksi imaju ujednačenu gustoću naboja i tijekom elektroforeze migriraju na osnovu molekulskih masa. Utvrđeno je da je u takvim uvjetima grafički odnos $\log_{10} M_r$ i R_f vrijednosti (udaljenost koju prijeđe protein prema udaljenosti koju prijeđe boja) strogo linearan. Stoga se za kalibraciju gel sustava koristi set proteina poznatih molekulskih masa koji se razdvoji, a potom i vizualizira zajedno s analiziranim uzorcima. Za izradu kalibracijskog pravca izračunaju se R_f vrijednosti markera i na semilogaritamskoj skali ucrtaju u odnosu na molekulske mase. Nakon toga se R_f vrijednosti proteina u uzorcima koriste kako bi se iz kalibracijskog pravca očitala njihova molekulska masa.

4.7. Western-blot

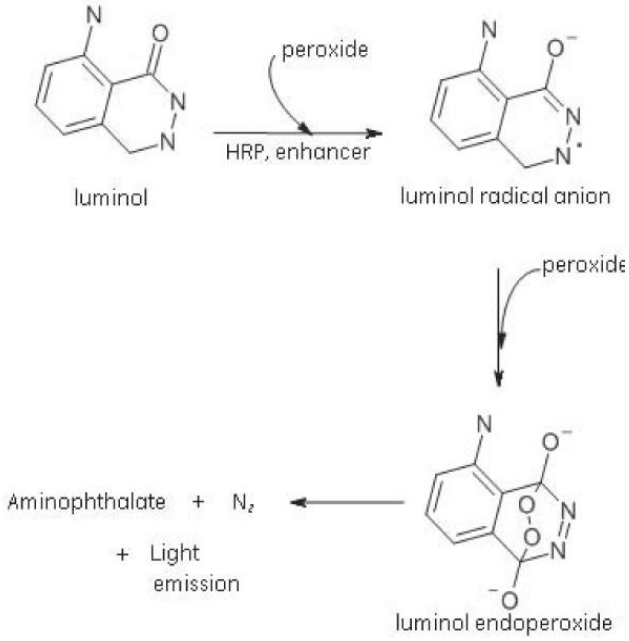
Western blot ili imuno-blot je tehnika kojom se proteini razdvojeni elektroforezom prenose na nitroceluloznu ili sintetsku membranu djelovanjem istosmjerne električne struje. Metodu koristimo za detekciju proteina korištenjem specifičnih protutijela. Specifičnost interakcije antigen-protutijelo omogućuje identifikaciju ciljnog proteina unutar kompleksne smjese proteina.

Proteini iz ekstrakata komorača, patlidžana i jabuke razdvojeni su denaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu kao što je opisano u prethodnom poglavlju. Nakon elektroforeze gel je uronjen u *katodni pufer* (0,025 M Tris/HCl; 0,04 M glicin; 20 % metanol; pH 9,4). Potom je napravljen složaj za Western blot. Složaj se sastoji od dva filter papira natopljena *anodnim puferom I* (0,3 M Tris/HCl; 20 % metanol; pH 10,4), jednog filter papira i Immobilon-PVDF membrane (prethodno navlažene metanolom) natopljenima *anodnim puferom II* (0,025 M Tris/HCl; 20 % metanol; pH 10,4), te od razdvajajućeg gela i 3 filter papira natopljena *katodnim puferom*. Složaj je prenesen na anodnu ploču uređaja za polusuhi elektroforetski prijenos (The W.E.P. Company, Semi-Dry Blotting System, IMM^{TM}-1-A). Nakon opreznog istiskivanja mjehurića zraka, na složaj je postavljena katodna ploča. Proteini u gelu su negativno nabijeni pa po uspostavljanju kruga istosmjerne električne struje putuju prema anodi, tj. iz gela prelaze na nitroceluloznu membranu. Prijenos traje 1 sat pri gustoći električne struje od 0,8 mA/cm^2. Shematski prikaz složaja za Western blot analizu prikazan je na Slici 10.



Slika 10. Shematski prikaz složaja za Western blot analizu

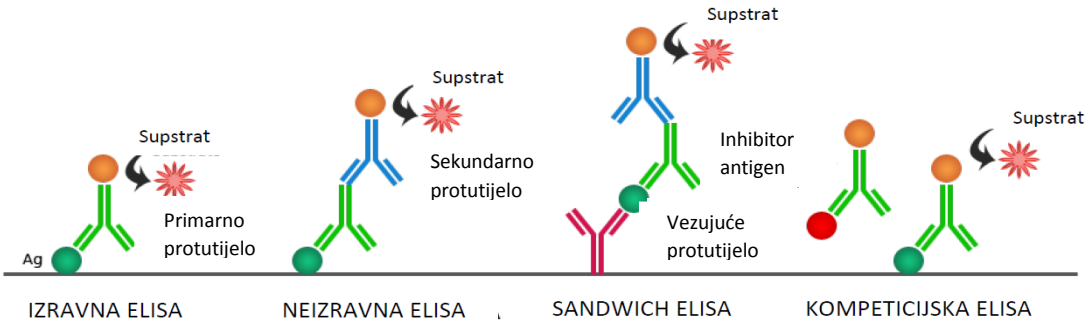
Membrana je potom inkubirana u otopini 3 % BSA u TBS-u (0,5 M Tris/HCl, 1,5 M NaCl; pH 7,5). BSA blokira slobodna mjesta na membrani i tako sprečava nespecifično vezanje protutijela. Nakon inkubacije koja je trajala preko noći na 4°C membrana je isprana u puferu TBST (PBS, 0,1 % Tween 20; pH 7,5) 3 puta po 10 minuta. Potom je membrana inkubirana 2 h na 37 °C uz dodatak objedinjenog seruma četiriju ispitanika, razrijeđenog u omjeru 1:10 puferom TBS, te nakon toga isprana u puferu TBST 3 puta po 10 minuta. Membrana je zatim inkubirana 1 h u otopini detekcijskog protutijela (kozje IgG protutijelo razvijeno naspram molekule humanog IgE, obilježeno peroksidazom iz hrena), tako da je njegova komercijalno pripremljena otopina razrijeđena u puferu TBS u omjeru 1:2000. Detekcija proteina na membrani provedena je kemiluminiscencijskom metodom, uz uporabu komercijalnog kompleta Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) prema uputama proizvođača. Reakcija detekcije je posredovana enzimom konjugiranim s detekcijskim protutijelom, gdje enzim peroksidaza katalizira oksidaciju supstrata luminola (Slika 11) te je emisija svjetlosti proporcionalna količini proteina koji se detektira. Membrana je analizirana i dokumentirana uređajem Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).



Slika 11. Reakcija detekcije proteina kemiluminiscencijskom metodom posredovana peroksidazom iz hrena (preuzeto iz Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent Product booklet)

4.8. ELISA

ELISA (*engl.* enzyme-linked immunosorbent assay) je imunokemijska metoda za detekciju i/ili kvantifikaciju antigena imobiliziranog na mikrotitarskoj pločici, a temelji se na specifičnom prepoznavanju antigena i protutijela uz detekciju nastanka kompleksa osjetljivom enzimskom reakcijom. S obzirom na način vezanja antigena, osnovne izvedbe uključuju izravnu, neizravnu, sendvič i kompeticijsku metodu ELISA (Slika 12), no postoji i niz kompleksnijih izvedbi prilagođenih za različite tipove analiza.



Slika 12. Različite izvedbe metode ELISA (preuzeto i prilagođeno iz https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisaprinciple)

Proteinski ekstrakti komorača, patlidžana i jabuke naneseni su u duplikatu u bunariće mikrotitarske pločice u volumenu od 100 µL (5 µg proteina po jažici, uz prethodno razrjeđenje ekstrakta 50 mM karbonatnim puferom, pH 9,6 na koncentraciju 50 µg/mL) te inkubirani preko noći na 4 °C. Bunarići su 3 puta isprani puferom PBST (10 mM Na_2HPO_4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,05 % Tween® 20; pH 7,4) te je dodano 200 µL otopine 3 % BSA u PBS uz inkubaciju 1 h na 37 °C. Nakon ispiranja 3 puta puferom PBST u bunariće je dodano 100 µL objedinjenog seruma četiriju ispitanika razrijeđenog u omjeru 1:10 puferom PBS (10 mM Na_2HPO_4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7,4) te inkubirano 2 h na 37 °C. Nakon ispiranja puferom PBST 3 puta, u bunariće je dodano 100 µL detekcijskog protutijela u razrjeđenju puferom PBS 1:2000 (kozje IgG protutijelo razvijeno naspram molekule humanog IgE, obilježeno peroksidazom iz hrena), a inkubacija je trajala 1 h na 37 °C. Nakon ispiranja puferom PBST 3 puta, dodano je 100 µL otopine supstrata za peroksidazu iz hrena uz inkubaciju od 20 min na sobnoj temperaturi. Supstrat o-fenilendiamin dihidroklorid (OPD) otopljen je do konačne koncentracije 0,5 mg/mL u OPD puferu (0,05 M limunska kiselina;

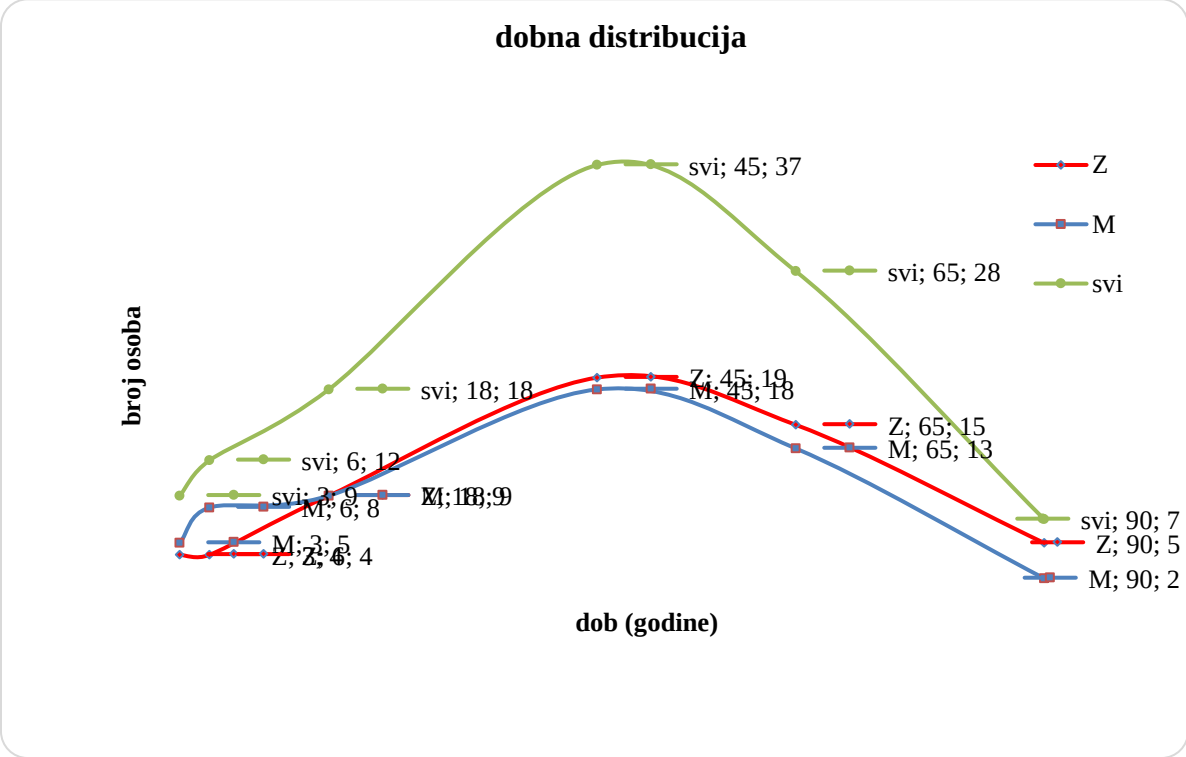
0,05 M natrijev fosfat; pH 5,0) uz dodatak 30 % H_2O_2. Reakcija je zaustavljena dodatkom 2,5 M H_2SO_4. Apsorbancija pri 490 nm izmjerena je čitačem mikrotitarskih pločica Wallac 1420 Victor2^{TM} (Perkin Elmer Inc., USA). Kod slijepe probe, proteinski ekstrakt je zamijenjen 50 mM karbonatnim puferom, pH 9,6, a kao negativna kontrola poslužio je serum osobe koja nije alergična na ispitivano voće i povrće.

5. REZULTATI

Rezultati koji slijede prikazuju obrađene podatke o:

- Normalnosti distribucije podataka o dobi ispitanika (Slika 13)
- Srednjoj vrijednosti s pripadnim rasponom (minimumom, maksimumom) te standardnom devijacijom za dob ispitanika prema spolu (Tablica 11)
- Srednjoj vrijednosti s pripadnim rasponom (minimumom, maksimumom) te standardnom devijacijom za vrijednost specifičnog imunoglobulina E, prema spolu (redom Tablice 15-17; Tablice 19-21; Tablice 23-25)
- Frekvenciji za vrijednosti specifičnog imunoglobulina E, prema kategorijama voće, povrće i orašasti plodovi, prema spolu (Tablice 18, 22 i 26)
- Elektroforezi proteinskih ekstrakata (Slike 21-23)
- Detekciji proteina Western blot metodom (Slike 24-26)
- Imunokemijskoj detekciji alergenih proteina metodom ELISA (Tablice 45-47, te Slike 27-29)

5.1. Distribucija ispitanika



Slika 13. Normalnost distribucije ispitanika prema dobi i spolu

Tablica 11. Prosječna dob ispitanika (godine)

	M (n_1=55)	Ž (n_2=56)	Svi (n=111)
SV	29,04	34,96	32,03
SD	21,20	23,04	22,40
Minimum	1	2	1
Maksimum	78	82	82

M – muškarci; Ž – žene; SV – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija

Tablica 12. Frekvencijska raspodjela dobi ispitanika prema spolu, u 6 frekvencijskih razreda

Razredi (dob)	**Stvarna frekvencija (n)**			**Relativna frekvencija (%)**		
	M	Ž	Svi	M	Ž	Svi
0-3,0	5	4	9	9,1	7,1	8,1
3,1-6,0	8	4	12	14,5	7,1	10,8
6,1-18,0	9	9	18	16,4	16,1	16,2
18,1-45,0	18	19	37	32,7	33,9	33,3
45,1-65,0	13	15	28	23,6	26,8	25,2
>65	2	5	7	3,6	8,9	6,3
Σ	55	56	111	100,0	100,0	100,0

M - muškarci, Ž - žene

Tablica 13. Rezultati testiranja normalnosti distribucije (prikaz p-vrijednosti)

Promatrani skup ispitanika	**Testovi***			
	Shapiro-Wilk	**Anderson-Darling**	**Lillefors**	**Jarque-Bera**
M	0,94	0,89	0,79	0,85
Ž	0,16	0,18	0,27	0,68
Svi	0,42	0,43	0,57	0,71

M – muškarci, Ž – žene

*Hipoteza (H_0: normalnost distribucije u promatranom skupu podataka) se odbacuje za $p<0,05$

Tablica 14. Momenti statističkog skupa dob, za promatranu populaciju

Parametri	Momenti	M	Ž	Svi
SV (godine)	M1	29,04	34,96	32,03
SD (godine)		21,52	23,04	22,40
Varijanca (godine^2)	M2	463,26	530,73	501,64
Asimetrija	$\alpha 3$	0,29	0,10	0,18
Spljoštenost	$\alpha 4$	1,80	1,74	1,74

M – muškarci, Ž – žene

Tablica 15. Srednje vrijednosti s pripadnim rasponom i standardnom devijacijom (SD) za utvrđeni specifični imunoglobulin E voća u muškaraca

Voće	n	**Raspon** (FIU/mL)	$\bar{x}$ **± SD** (FIU/mL)
Kivi	3	0,61 - 2,30	1,24 ± 0,92
Ananas	4	0,61 - 5,29	2,09 ± 2,2
Rogač	12	0,59 - 2,53	1,35 ± 0,68
Mandarina	9	0,40 - 2,33	1,17 ± 0,71
Dinja, pulpa	5	0,83 - 3,37	1,45 ± 1,09
Jagoda	11	0,38 - 1,76	0,86 ± 0,42
Jabuka	12	0,53 - 6,29	2,11 ± 1,96
Avokado	8	0,43 - 1,79	0,99 ± 0,46
Marelica	6	0,54 - 9,1	4,05 ± 3,77
Breskva, kora	8	0,32 - 8,72	3,07 ± 3,24
Breskva, pulpa	10	0,62 - 5,56	1,9 ± 1,88
Nar	1	10,99 - 10,99	10,99 ± 0,00
Grožđe	6	0,037 - 2,81	1,49 ± 0,94

Tablica 16. Srednje vrijednosti s pripadnim rasponom i standardnom devijacijom (SD) za utvrđen specifični imunoglobulin E kod voća u žena

Voće	**n**	**Raspon (FIU/mL)**	**$\bar{x}$ ± SD (FIU/mL)**
Kivi	5	0,41 - 14,37	3,76 ± 6,01
Ananas	4	0,44 - 3,22	1,31 ± 1,28
Rogač	8	0,62 - 15,67	3,81 ± 4,88
Mandarina	6	1,08 - 21,92	5,52 ± 8,07
Dinja, pulpa	6	0,81 - 9,47	2,47 ± 3,43
Jagoda	8	0,41 - 15,83	3,83 ± 5,10
Jabuka	9	0,65 - 92,33	14,31 ± 30,10
Avokado	8	0,64 - 17,61	3,34 ± 5,80
Marelica	6	0,49 - 131,58	24,32 ± 52,62
Breskva, kora	7	0,65 - 160,47	26,04 ± 59,39
Breskva, pulpa	8	0,44 - 84,57	12,55 ± 29,14
Nar	3	0,89 - 4,13	2,21 ± 1,70
Grožđe	5	1,20 - 112,04	23,49 ± 49,5

Tablica 17. Srednje vrijednosti s pripadnim rasponom i standardnom devijacijom (SD) za utvrđeni specifični imunoglobulin E voća, za promatranu populaciju

Voće	**n**	**Raspon** (FIU/mL)	$\bar{x}$ **± SD** (FIU/mL)
Kivi	8	0,41 - 14,37	2,81 ± 4,75
Ananas	8	0,44 - 5,29	1,7 ± 1,72
Rogač	20	0,59 - 15,67	2,33 ± 3,25
Mandarina	15	0,4 - 21,92	2,91 ± 5,33
Dinja, pulpa	11	0,81 - 9,47	2,01 ± 2,58
Jagoda	19	0,38 - 15,83	2,11 ± 3,53
Jabuka	21	0,53 - 92,33	7,34 ± 20,07
Avokado	16	0,43 - 17,61	2,17 ± 4,16
Marelica	12	0,49 - 131,58	14,19 ± 37,11
Breskva, kora	15	0,32 - 160,47	13,79 ± 40,71
Breskva, pulpa	18	0,44 - 84,57	6,63 ± 19,53
Nar	4	0,89 - 10,99	4,41 ± 4,60
Grožđe	11	0,037 - 112,04	11,49 ± 33,36

Tablica 18. Frekvencija alergena koji pokazuju negativnu (<0,01 FIU/mL) ili pozitivnu (>0,3 FIU/mL) reakciju za kategoriju voće

Voće	Muškarci		Žene		Svi	
	<0,01 FIU/mL	**>0,3 FIU/mL**	**<0,01 FIU/mL**	**>0,3 FIU/mL**	**<0,01 FIU/mL**	**>0,3 FIU/mL**
Kivi	90,91	9,09	94,64	5,36	92,79	7,21
Ananas	90,91	9,09	94,64	5,36	92,79	7,21
Rogač	83,64*	16,36*	80,36*	19,64*	81,98	18,02
Mandarina	89,09	10,91*	83,93	16,07*	86,49	13,51
Dinja, pulpa	87,27	12,73*	92,86	7,14*	90,09	9,91
Jagoda	83,64	16,36	82,14	17,86	82,88	17,12
Jabuka	83,64	16,36*	78,57	21,43*	81,08	18,92
Avokado	85,45	14,55	85,71	14,29	85,59	14,41
Marelica	90,91	9,09*	87,50	12,50*	89,19	10,81
Breskva, kora	87,27	12,73	85,71	14,29	86,49	13,51
Breskva, pulpa	85,45	14,55	82,14	17,86	83,78	16,22
Nar	96,36	3,64	96,43	3,57	96,40	3,60
Grožđe	90,91	7,27*	89,29	10,71*	90,09	9,01

*utvrđena vrijednost p<0,05, što upućuje na značajne razliku

Tablica 19. Srednje vrijednosti s pripadnim rasponom i standardnom devijacijom (SD) za utvrđeni specifični imunoglobulin E povrća te dva začina (sezam, senf) u muškaraca

Povrće i začini	**n**	**Raspon** (FIU/mL)	$\bar{x}$ **± SD** (FIU/mL)
Luk	5	0,60 - 6,62	3,41 ± 2,68
Patlidžan	11	0,27 - 3,85	1,26 ± 1,11
Krumpir	5	0,80 - 6,62	2,86 ± 2,58
Poriluk	12	0,47 - 7,91	2,48 ± 2,54
Češnjak	6	0,64 - 13,53	4,27 ± 5,13
Celer	9	0,94 - 8,33	2,41 ± 2,29
Šparoga	8	0,41 - 2,39	0,93 ± 0,70
Hren	7	0,75 - 8,84	2,65 ± 2,84
Krastavac	7	0,60 - 3,29	1,18 ± 0,96
Mrkva	7	0,33 - 1,66	1,06 ± 0,54
Komorač, gomolj	10	0,32 - 7,55	2,26 ± 2,54
Rajčica	8	0,49 - 5,47	1,37 ± 1,69
Špinat	7	0,52 - 6,84	2,03 ± 2,25
Sezam	3	0,61 - 24,56	8,6 ± 13,82
Senf	1	1,11 - 1,11	1,11 ± 0,00

Tablica 20. Srednje vrijednosti s pripadnim rasponom i standardnom devijacijom (SD) za utvrđeni specifični imunoglobulin E povrća te dva začina (sezam, senf) u žena

Povrće i začini	**n**	**Raspon** (FIU/mL)	$\bar{x}$ **± SD** (FIU/mL)
Luk	4	0,91 - 39,03	10,89 ± 18,77
Patlidžan	8	0,79 - 25,90	5,30 ± 8,41
Krumpir	5	0,67 - 1,43	1,03 ± 0,29
Poriluk	5	0,92 - 99,64	21,85 ± 43,51
Češnjak	5	0,52 - 54,9	12,71 ± 23,64
Celer	6	0,64 - 17,19	4,42 ± 6,48
Šparoga	5	0,97 - 25,67	6,13 ± 10,93
Hren	8	0,87 - 8,65	3,8 ± 2,74
Krastavac	7	0,49 - 10,29	2,58 ± 3,46
Mrkva	5	0,49 - 7,91	2,95 ± 2,89
Komorač, gomolj	7	0,62 - 155,11	25,08 ± 57,4
Rajčica	7	0,32 - 139,23	20,84 ± 52,21
Špinat	4	0,43 - 4,18	2,00 ± 1,81
Sezam	3	1,17 - 10,53	4,53 ± 5,21
Senf	2	1,17 - 17,74	9,46 ± 11,72

Tablica 21. Srednje vrijednosti s pripadnim rasponom i standardnom devijacijom (SD) za utvrđeni specifični imunoglobulin E povrća te dva začina (sezam, senf) za promatranu populaciju

Povrće i začini	**n**	**Raspon** (FIU/mL)	$\bar{x}$ **± SD** (FIU/mL)
Luk	9	0,60 – 39,03	6,73 ± 12,30
Patlidžan	19	0,27 – 25,90	2,96 ± 5,69
Krumpir	10	0,67 – 6,62	1,95 ± 1,98
Poriluk	17	0,47 – 99,64	8,17 ± 23,67
Češnjak	11	0,52 – 54,9	8,10 ± 16,00
Celer	15	0,64 – 17,19	3,21 ± 4,36
Šparoga	13	0,41 – 25,67	2,93 ± 6,86
Hren	15	0,75 – 8,84	3,26 ± 2,75
Krastavac	14	0,49 – 10,29	1,88 ± 2,54
Mrkva	12	0,33 – 7,91	1,85 ± 2,03
Komorač, gomolj	17	0,32 – 155,11	11,66 ± 37,06
Rajčica	15	0,32 – 139,23	10,46 ± 35,65
Špinat	11	0,43 – 6,84	2,02 ± 2,00
Sezam	6	0,61 – 24,56	6,56 ± 9,61
Senf	3	1,11 – 17,74	6,67 ± 9,58

Tablica 22. Frekvencija alergena koji pokazuju negativnu (<0,01 FIU/mL) ili pozitivnu (>0,3 FIU/mL) reakciju senzibilizacije za kategoriju povrće i začini

Povrće i začini	Muškarci		Žene		Svi	
	<0,01 FIU/mL	>0,3 FIU/mL	<0,01 FIU/mL	>0,3 FIU/mL	<0,01 FIU/mL	>0,3 FIU/mL
Luk	90,91	9,09	92,86	7,14	91,89	8,11
Patlidžan	83,64	16,36	82,14	16,07	82,88	16,22
Krumpir	90,91	9,09	91,07	8,93	90,99	9,01
Poriluk	87,27*	12,73*	82,14*	17,86*	84,68	15,32*
Češnjak	92,73	7,27	87,50	12,50	90,09	9,91
Celer	87,27	12,73	85,71	14,29	86,49	13,51
Šparoga	87,27	12,73	89,29	10,71	88,29	11,71
Hren	80,00*	20,00*	92,86*	7,14*	86,49	13,51
Krastavac	87,27	12,73	87,50	12,50	87,39	12,61
Mrkva	90,91	9,09	87,50	12,50	89,19	10,81
Komorač gomolj	87,27*	12,73*	82,14	17,86	84,68	15,32
Rajčica	87,27	12,73	85,71	14,29	86,49	13,51
Špinat	89,09	10,91	91,07	8,93	90,09	9,91
Sezam	92,73*	7,27*	96,43*	3,57*	94,59	5,41
Senf	96,36	3,64	98,21	1,79	97,30	2,70

*utvrđena vrijednost p<0,05, što upućuje na značajne razlike

Tablica 23. Srednje vrijednosti s pripadnim rasponom i standardnom devijacijom (SD) za utvrđeni sadržaj alergena (FIU/mL) mahunarki, žitarica i orašastog voća u muškaraca

Mahunarke, žitarice i orašasto voće	**n**	**Raspon** (FIU/mL)	$\bar{x}$ **± SD** (FIU/mL)
Slanutak	8	0,53 – 4,97	1,87 ± 1,77
Soja	6	0,73 – 3,71	1,78 ± 1,17
Leća	8	0,51 – 7,75	1,58 ± 2,50
Heljda	7	0,51 – 2,75	1,47 ± 0,72
Lan	7	0,65 – 13,28	4,54 ± 4,74
Kukuruz	6	0,49 – 2,68	1,35 ± 0,85
Indijski orah	3	0,01 – 3,51	1,98 ± 1,80
Kikiriki	9	0,22 – 51,62	10,29 ± 16,58
Brazilski orah	6	0,20 – 1,63	0,84 ± 0,62
Lješnjak	5	0,38 – 30,81	6,70 ± 13,48
Orah	5	0,48 – 8,38	2,57 ± 3,33
Pistacija	8	0,06 – 3,64	1,25 ± 1,04
Pinjol	5	0,49 – 15,79	4,15 ± 6,56
Badem	7	0,65 – 3,13	1,34 ± 0,90

Tablica 24. Srednje vrijednosti s pripadnim rasponom i standardnom devijacijom (SD) za utvrđen sadržaj alergena (FIU/mL) mahunarki, žitarica i orašastog voća u žena

Mahunarke, žitarice i orašasto voće	**n**	**Raspon** (FIU/mL)	$\bar{x}$ **± SD** (FIU/mL)
Slanutak	6	0,51 - 11,34	3,42 ± 4,23
Soja	6	0,56 - 2,93	1,27 ± 0,85
Leća	6	0,39 - 7,71	1,95 ± 2,86
Heljda	7	0,49 - 7,67	3,50 ± 2,86
Lan	6	0,96 - 29,44	7,12 ± 11,17
Kukuruz	5	0,43 - 122,92	25,6 ± 54,41
Indijski orah	3	0,54 - 3,24	1,51 ± 1,50
Kikiriki	7	1,00 - 21,01	5,24 ± 7,30
Brazilski orah	0	0,00 – 0,00	0,00 ± 0,00
Lješnjak	5	0,16 - 26,61	7,84 ± 11,52
Orah	8	0,33 - 17,67	3,44 ± 5,81
Pistacija	5	0,97 - 2,80	1,58 ± 0,75
Pinjol	6	0,97 - 8,69	2,87 ± 2,94
Badem	8	0,32 - 13,71	2,84 ± 4,42

Tablica 25. Srednje vrijednosti s pripadnim rasponom i standardnom devijacijom (SD) za utvrđen sadržaj alergena (FIU/mL) mahunarki, žitarica i orašastog voća, za promatranu populaciju

Mahunarke, žitarice i orašasto voće	**n**	**Raspon** (FIU/mL)	$\bar{x}$ **± SD** (FIU/mL)
Slanutak	14	0,51 - 11,34	2,53 ± 3,03
Soja	12	0,56 - 3,71	1,52 ± 1,01
Leća	14	0,39 - 7,75	1,74 ± 2,55
Heljda	14	0,49 - 7,67	2,49 ± 2,27
Lan	13	0,65 - 29,44	5,73 ± 8,07
Kukuruz	11	0,43 - 122,92	12,37 ± 36,67
Indijski orah	6	0,01 - 3,51	1,75 ± 1,50
Kikiriki	16	0,22 - 51,62	8,08 ± 13,22
Brazilski orah	6	0,2 - 1,63	0,84 ± 0,62
Lješnjak	10	0,16 - 30,81	7,27 ± 11,84
Orah	13	0,33 - 17,67	3,11 ± 4,86
Pistacija	13	0,60 - 3,64	1,37 ± 0,92
Pinjol	11	0,49 - 15,79	3,45 ± 4,69
Badem	15	0,32 - 13,71	2,14 ± 3,27

Tablica 26. Frekvencija sadržaja alergena koji pokazuju negativnu (<0,01 FIU/mL) ili pozitivnu (>0,3 FIU/mL) reakciju senzibilizacije za kategoriju mahunarke, žitarice i orašasto voće

Mahunarke, žitarice i orašasto voće	**Muškarci**		**Žene**		**Svi**	
	<0,01 FIU/mL	**>0,3 FIU/mL**	**<0,01 FIU/mL**	**>0,3 FIU/mL**	**<0,01 FIU/mL**	**>0,3 FIU/mL**
Slanutak	89,09*	10,91*	85,71*	14,29*	87,39	12,61
Soja	89,09	10,91	89,29	10,71	89,19	10,81
Leća	87,27	12,73	87,50	12,50	87,39	12,61
Heljda	85,45*	14,55*	89,29*	10,71*	87,39	12,61
Lan	89,09	10,91	87,50	12,50	88,29	11,71
Kukuruz	85,45*	14,55*	94,64*	5,36*	90,09	9,91
Indijski orah	96,36	3,64	94,64	5,36	95,50	4,50
Kikiriki	85,45	14,55	85,71	12,50	85,59	13,51
Brazilski orah	92,73	3,64	96,43	3,57	94,59	3,60
Lješnjak	90,91	9,09	91,07	7,14	90,99	8,11
Orah	89,09	10,91	87,50	12,50	88,29	11,71
Pinjol	89,09	10,91	91,07	8,93	90,09	9,91
Pistacija	87,27	12,73	89,29	10,71	88,29	11,71
Badem	87,27	12,73	85,71	14,29	86,49	13,51

*utvrđena vrijednost p<0,05, što upućuje na značajne razlike

Tablica 27. Udio muškaraca prema dobnim skupinama za negativnu (<0,01 FIU/mL), graničnu (0,01-0,3 FIU/mL) i pozitivnu senzibilizaciju (>0,3 FIU/mL) za kategoriju voće

	FIU/mL	Dob (godine)						Ukupno
		<3	3-6	6-18	18-45	45-65	65+	
Kivi	<0,01	10,00	16, 00	16,00	30,00	24,00	4,00	90,91
	>0,3	0,00	0,00	20,00	60,00	20,00	0,00	9,09
Ananas	<0,01	10,00	14,00	16,00	32,00	24,00	4,00	90,91
	>0,3	0,00	20,00	20,00	40,00	20,00	0,00	9,09
Rogač	<0,01	8,70	13,04	17,39	32,61	23,91	4,35	83,64
	>0,3	11,11	22,22	11,11	33,33	22,22	0,00	16,36
Mandarina	<0,01	8,16	14,29	18,37	32,65	22,45	4,08	89,09
	>0,3	16,67	16,67	0,00	33,33	33,33	0,00	10,91
Dinja	<0,01	8,33	12,50	16,67	35,42	22,92	4,17	87,27
	>0,3	14,29	28,57	14,29	14,29	28,57	0,00	12,73
Jagoda	<0,01	6,52	15,22	17,39	32,61	23,91	4,35	83,64
	>0,3	22,22	11,11	11,11	33,33	22,22	0,00	16,36
Jabuka	<0,01	8,70	13,04	17,39	32,61	23,91	4,35	83,64
	>0,3	11,11	22,22	11,11	33,33	22,22	0,00	16,36
Avokado	<0,01	8,51	12,77	19,15	31,91	23,40	4,26	85,45
	>0,3	12,50	25,00	0,00	37,50	25,00	0,00	14,55
Pistacija	<0,01	8,33	12,50	16,67	33,33	25,00	4,17	87,27
	>0,3	14,29	28,57	14,29	28,57	14,29	0,00	12,73
Marelica	<0,01	8,00	14,00	18,00	32,00	24,00	4,00	90,91
	>0,3	20,00	20,00	0,00	40,00	20,00	0,00	9,09
Breskva	<0,01	8,33	14,58	16,67	33,33	22,92	4,17	87,27
	>0,3	14,29	14,29	14,29	28,57	28,57	0,00	12,73
Breskva	<0,01	8,51	14,89	14,89	34,04	23,40	4,26	85,45
	>0,3	12,50	12,50	25,00	25,00	25,00	0,00	14,55
Nar	<0,01	9,43	13,21	16,98	33,96	22,64	3,77	96,36
	>0,3	0,00	50,00	0,00	0,00	50,00	0,00	3,64
Grožđe	<0,01	8,00	14,00	18,00	32,00	24,00	4,00	90,91
	0,01-0,3	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	1,82
	>0,3	25,00	25,00	0,00	25,00	25,00	0,00	7,27

Tablica 28. Udio muškaraca prema dobnim skupinama za negativnu (<0,01 FIU/mL), graničnu (0,01-0,3 FIU/mL) i pozitivnu senzibilizaciju (>0,3 FIU/mL) za kategoriju povrće

	FIU/mL	Dob (godine)						Ukupno
		<3	3-6	6-18	18-45	45-65	65+	
Luk	<0,01	8,00	14,00	16,00	32,00	26,00	4,00	90,91
	>0,3	20,00	20,00	20,00	40,00	0,00	0,00	9,09
Patlidžan	<0,01	8,70	13,04	15,22	34,78	23,91	4,35	83,64
	>0,3	11,11	22,22	22,22	22,22	22,22	0,00	16,36
Krumpir	<0,01	8,00	16,00	16,00	32,00	2400	4,00	90,91
	>0,3	20,00	0,00	20,00	40,00	20,00	0,00	9,09
Poriluk	<0,01	8,33	12,50	16,67	33,33	25,00	4,17	87,27
	>0,3	14,29	28,57	14,29	28,57	14,29	0,00	12,73
Češnjak	<0,01	9,80	13,73	17,65	31,37	23,53	3,92	92,73
	>0,3	0,00	25,00	0,00	50,00	25,00	0,00	7,27
Celer	<0,01	10,42	12,50	18,75	31,25	22,92	4,17	87,27
	>0,3	0,00	28,57	0,00	42,86	28,57	0,00	12,73
Šparoga	<0,01	8,33	12,50	16,67	33,33	25,00	4,17	87,27
	>0,3	14,29	28,57	14,29	28,57	14,29	0,00	12,73
Hren	<0,01	6,82	15,91	18,18	29,55	25,00	4,55	80,00
	>0,3	18,18	9,09	9,09	45,45	18,18	0,00	20,00
Krastavac	<0,01	8,33	12,50	18,75	33,33	22,92	4,17	87,27
	>0,3	14,29	28,57	0,00	28,57	28,57	0,00	12,73
Mrkva	<0,01	10,00	12,00	18,00	32,00	24,00	4,00	90,91
	>0,3	0,00	40,00	0,00	40,00	20,00	0,00	9,09
Komorač	<0,01	8,33	14,58	18,75	31,25	22,92	4,17	87,27
	>0,3	14,29	14,29	0,00	42,86	28,57	0,00	12,73
Rajčica	<0,01	8,33	12,50	18,75	33,33	22,92	4,17	87,27
	>0,3	14,29	28,57	0,00	28,57	28,57	0,00	12,73
Špinat	<0,01	8,16	12,24	18,37	32,65	24,49	4,08	89,09
	>0,3	16,67	33,33	0,00	33,33	16,67	0,00	10,91
Sezam	<0,01	9,80	13,73	15,69	33,33	23,53	3,92	92,73
	>0,3	0,00	25,00	25,00	25,00	25,00	0,00	7,27
Senf	<0,01	9,43	15,09	16,98	32,08	22,64	3,77	96,36
	>0,3	0,00	0,00	0,00	50,00	50,00	0,00	3,64

Tablica 29. Udio muškaraca prema dobnim skupinama za negativnu (<0,01 FIU/mL), graničnu (0,01-0,3 FIU/mL) i pozitivnu senzibilizaciju (>0,3 FIU/mL) za kategoriju mahunarke, žitarice i orašasti plodovi

	FIU/mL	Dob (godine)						Ukupno
		<3	3-6	6-18	18-45	45-65	65+	
Slanutak	<0,01	6,12	14,29	18,37	32,65	24,49	4,08	89,09
	>0,3	33,33	16,67	0,00	33,33	16,67	0,00	10,91
Soja	<0,01	8,16	14,29	18,37	30,61	24,49	4,08	89,09
	>0,3	16,67	16,67	0,00	50,00	16,67	0,00	10,91
Leća	<0,01	6,25	14,58	16,67	33,33	25,00	4,17	87,27
	>0,3	28,57	14,29	14,29	28,57	14,29	0,00	12,73
Heljda	<0,01	8,51	12,77	17,02	34,04	23,40	4,26	85,45
	>0,3	12,50	25,00	12,50	25,00	25,00	0,00	14,55
Lan	<0,01	8,16	14,29	16,33	34,69	22,45	4,08	89,09
	>0,3	16,67	16,67	16,67	16,67	33,33	0,00	10,91
Kukuruz	<0,01	6,38	12,77	19,5	34,04	23,40	4,26	85,45
	>0,3	25,00	25,00	0,00	25,00	25,00	0,00	14,55
Indijski orah	<0,01	7,55	13,21	16,98	33,96	24,53	3,77	96,36
	>0,3	50,00	50,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,64
Kikiriki	<0,01	6,38	12,77	19,15	31,91	25,53	4,26	85,45
	>0,3	25,00	25,00	0,00	37,50	12,50	0,00	14,55
Brazilski orah	<0,01	7,84	11,76	15,69	35,29	25,49	3,92	92,73
	0,01-0,3	0,00	50,00	50,00	0,00	0,00	0,00	3,64
	>0,3	50,00	50,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,64

Lješnjak	<0,01	6,00	14,00	18,00	34,00	24,00	4,00	90,91
	>0,3	40,00	20,00	0,00	20,00	20,00	0,00	9,09
Orah	<0,01	8,16	14,29	18,37	32,65	22,45	4,08	89,09
	>0,3	16,67	16,67	0,00	33,33	33,33	0,00	10,91
Pinjol	<0,01	10,20	14,29	16,33	32,65	22,45	4,08	89,09
	>0,3	0,00	16,67	16,67	33,33	33,33	0,00	10,91
Badem	<0,01	6,25	12,50	18,75	35,42	22,92	4,17	87,27
	>0,3	28,57	28,57	0,00	14,29	28,57	0,00	12,73

Tablica 30. Udio žena prema dobnim skupinama za negativnu (<0,01 FIU/mL), graničnu (0,01-0,3 FIU/mL) i pozitivnu senzibilizaciju (>0,3 FIU/mL) za kategoriju voće

	FIU/mL	Dob (godine)						Ukupno
		<3	3-6	6-18	18-45	45-65	65+	
Kivi	<0,01	7,55	5,66	15,09	33,96	28,30	9,43	94,64
	>0,3	0,00	33,33	33,33	33,33	0,00	0,00	5,36
Ananas	<0,01	7,55	5,66	15,09	33,96	28,30	9,43	94,64
	>0,3	0,00	33,33	33,33	33,33	0,00	0,00	5,36
Rogač	<0,01	4,44	4,44	15,56	37,78	31,11	6,67	80,36
	>0,3	18,18	18,18	18,18	18,18	9,09	18,18	19,64
Mandarina	<0,01	6,38	4,26	17,02	36,17	29,79	6,38	83,93
	>0,3	11,11	22,22	11,11	22,22	11,11	22,22	16,07
Dinja	<0,01	7,69	5,77	15,38	34,62	28,85	7,69	92,86
	>0,3	0,00	25,00	25,00	25,00	0,00	25,00	7,14
Jagoda	<0,01	6,52	4,35	15,22	34,78	30,43	8,70	82,14
	>0,3	10,00	20,00	20,00	30,00	10,00	10,00	17,86
Jabuka	<0,01	4,55	4,55	18,18	31,82	34,09	6,82	78,57
	>0,3	16,67	16,67	8,33	41,67	0,00	16,67	21,43
Avokado	<0,01	8,33	4,17	16,67	33,33	29,17	8,33	85,71
	>0,3	0,00	25,00	12,50	37,50	12,50	12,50	14,29
Marelica	<0,01	8,16	6,12	16,33	34,69	28,57	6,12	87,50
	>0,3	0,00	14,29	14,29	28,57	14,29	28,57	12,50
Breskva	<0,01	6,25	6,25	16,67	35,42	29,17	6,25	85,71
	>0,3	12,50	12,50	12,50	25,00	12,50	25,00	14,29

Breskva	<0,01	6,52	4,35	17,39	34,78	30,43	6,52	82,14
	>0,3	10,00	20,00	10,00	30,00	10,00	20,00	17,86
Nar	<0,01	7,41	5,56	16,67	33,33	27,78	9,26	96,43
	>0,3	0,00	50,00	0,00	50,00	0,00	0,00	3,57
Grožđe	<0,01	8,00	6,00	16,00	34,00	28,00	8,00	89,29
	>0,3	0,00	16,67	16,67	33,33	16,67	16,67	10,71

Tablica 31. Udio žena prema dobnim skupinama za negativnu (<0,01 FIU/mL), graničnu (0,01-0,3 FIU/mL) i pozitivnu senzibilizaciju (>0,3 FIU/mL) za kategoriju povrće i začini

	FIU/mL	Dob (godine)						Ukupno
		<3	3-6	6-18	18-45	45-65	65+	
Luk	<0,01	7,69	7,69	15,38	32,69	28,85	7,69	92,86
	>0,3	0,00	0,00	25,00	50,00	0,00	25,00	7,14
Patlidžan	<0,01	4,35	4,35	17,39	34,78	30,43	8,70	82,14
	0,01-0,3	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	1,79
	>0,3	22,22	22,22	11,11	33,33	0,00	11,11	16,07
Krumpir	<0,01	3,92	5,88	15,69	37,25	29,41	7,84	91,07
	>0,3	40,00	20,00	20,00	0,00	0,00	20,00	8,93
Poriluk	<0,01	6,52	4,35	17,39	34,78	30,43	6,52	82,14
	>0,3	10,00	20,00	10,00	30,00	10,00	20,00	17,86
Češnjak	<0,01	6,12	2,04	16,33	36,73	30,61	8,16	87,50
	>0,3	14,29	42,86	14,29	14,29	0,00	14,29	12,50
Celer	<0,01	6,25	4,17	16,67	33,33	31,25	8,33	85,71
	>0,3	12,50	25,00	12,50	37,50	0,00	12,50	14,29
Šparoga	<0,01	6,00	6,00	16,00	34,00	30,00	8,00	89,29
	>0,3	16,67	16,67	16,67	33,33	0,00	16,67	10,71
Hren	<0,01	7,69	5,77	15,38	32,69	28,85	9,62	92,86
	>0,3	0,00	25,00	25,00	50,00	0,00	0,00	7,14
Krastavac	<0,01	8,16	4,08	16,33	34,69	28,57	8,16	87,50
	>0,3	0,00	28,57	14,29	28,57	14,29	14,29	12,50
Mrkva	<0,01	8,16	8,16	16,33	30,61	28,57	8,16	87,50

	>0,3	0,00	0,00	14,29	57,14	14,29	14,29	12,50
Komorač	<0,01	4,35	4,35	15,22	36,96	30,43	8,70	82,14
	>0,3	20,00	2000	20,00	20,00	10,00	10,00	17,86
Rajčica	<0,01	6,25	4,17	16,67	35,42	29,17	8,33	85,71
	>0,3	12,50	25,00	12,50	25,00	12,50	12,50	14,29
Špinat	<0,01	7,84	3,92	15,69	33,33	29,41	9,80	91,07
	>0,3	0,00	40,00	20,00	40,00	0,00	0,00	8,93
Sezam	<0,01	7,41	5,56	16,67	33,33	27,78	9.,26	96,43
	>0,3	0,00	50,00	0,00	50,00	0,00	0,00	357
Senf	<0,01	727	7,27	16,36	32,73	27,27	9,09	98,21
	>0,3	0.,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	1,79

Tablica 32. Udio žena prema dobnim skupinama negativnu (<0,01 FIU/mL), graničnu (0,01-0,3 FIU/mL) i pozitivnu senzibilizaciju (>0,3 FIU/mL) za kategoriju mahunarke, žitarice i orašasti plodovi

	FIU/mL	Dob (godine)						Ukupno
		<3	3-6	6-18	18-45	45-65	65+	
Slanutak	<0,01	4,17	6,25	16,67	33,33	31,25	8,33	85,71
	>0,3	25,00	12,50	12,50	37,50	0,00	12,50	14,29
Soja	<0,01	4,00	4,00	16,00	36,00	30,00	10,00	89,29
	>0,3	3,33	33,33	16,67	16,67	0,00	0,00	10,71
Leća	<0,01	6,12	6,12	16,33	30,61	30,61	10,20	87,50
	>0,3	14,29	14,29	14,29	57,14	0,00	0,00	12,50
Heljda	<0,01	8,00	6,00	16,00	34,00	30,00	6,00	89,29
	>0,3	0,00	16,67	16,67	33,33	000	33,33	10,71
Lan	<0,01	6,12	4,08	16,33	32,65	30,61	10,20	87,50
	>0,3	14,29	28,57	14,29	42,86	0,00	0.,00	12,50
Kukuruz	<0,01	7,55	5,66	15,09	33,96	28,30	943	94,64
	>0,3	0,00	33,33	33,33	33,33	0,00	0,00	5,36
Indijski orah	<0,01	5,66	5,66	16,98	33,96	28,30	9,43	94,64
	>0,3	33,33	33,33	0,00	33,33	0,00	0,00	5,36
Kikiriki	<0,01	4,17	6,25	16,67	33,33	31,25	8,33	85,71
	0,01-0,3	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	1,79
	>0,3	28,57	14,29	14,29	28,57	0,00	14,29	12,50
Brazilski orah	<0,01	5,56	7,41	16,67	33,33	27,78	9,26	96,43

	>0,3	50,00	0,00	0,00	50,00	0,00	0,00	3,57
Lješnjak	<0,01	5,88	5,88	17,65	31,37	29,41	9,80	91,07
	0,01-0,3	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	1,79
	>0,3	25,00	25,00	0,00	50,00	0,00	0,00	7,14
Orah	<0,01	4,08	6,12	16,33	34,69	30,61	8,16	87,50
	>0,3	28,57	14,29	14,29	28,57	0,00	14,29	12,50
Pistacija	<0,01	4,00	6,00	18,00	34,00	30,00	8,00	89,29
	>0,3	33,33	16,67	0,00	33,33	0,00	16,67	10,71
Pinjol	<0,01	7,84	5,88	15,69	33,33	29,41	7,84	91,07
	>0,3	0,00	20,00	20,00	40,00	0,00	20,00	8,93
Badem	<0,01	6,25	6,25	16,67	33,33	29,17	8,33	85,71
	>0,3	12,50	12,50	12,50	37,50	12,50	12,50	14,29

Tablica 33. Udio promatrane populacije prema dobnim skupinama za negativnu (<0,01 FIU/mL), graničnu (0,01-0,3 FIU/mL) i pozitivnu senzibilizaciju (>0,3 FIU/mL) za kategoriju voće

	FIU/mL	Dob (godine)						Ukupno
		<3	3-6	6-18	18-45	45-65	65+	
Kivi	<0,01	8,74	10,68	15,53	32,04	26,21	6,80	92,79
	>0,3	0,00	12,50	25,00	50,00	12,50	0,00	7,21
Ananas	<0,01	8,74	9,71	15,53	33,01	26,21	6,80	92,79
	>0,3	0,00	25,00	25,00	37,50	12,50	0,00	7,21
Rogač	<0,01	6,59	8,79	16,48	35,16	27,47	5,49	81,98
	>0,3	15,00	20,00	15,00	25,00	15,00	10,00	18,02
Mandarina	<0,01	7,29	9,38	17,71	34,38	26,04	5,21	86,49
	>0,3	13,33	20,00	6,67	26,67	20,00	13,33	13,51
Dinja, pulpa	<0,01	8,00	9,00	16,00	35,00	26,00	6,00	90,09
	>0,3	9,09	27,27	18,18	18,18	18,18	9,09	9,91
Jagoda	<0,01	6,52	9,78	16,30	33,70	27,17	6,52	82,88
	>0,3	15,79	15,79	15,79	31,58	15,79	5,26	17,12
Jabuka	<0,01	6,67	8,89	17,78	32,22	28,89	5,56	81,08
	>0,3	14,29	19,05	9,52	38,10	9,52	9,52	18,92
Avokado	<0,01	8,42	8,42	17,89	32,63	26,32	6,32	85,59
	>0,3	6,25	25,00	6,25	37,50	18,75	6,25	14,41
Marelica	<0,01	8,08	10,10	17,17	33,33	26,26	5,05	89,19
	>0,3	8,33	16,67	8,33	33,33	16,67	16,67	10,81
Breskva, kora	<0,01	7,29	10,42	16,67	34,38	26,04	5,21	86,49
	>0,3	13,33	13,33	13,33	26,67	20,00	13,33	13,51
Breskva,	<0,01	7,53	9,68	16,13	34,41	26,88	5,38	83,78
	>0,3	11,11	16,67	16,67	27,78	16,67	11,11	16,22
Nar	<0,01	8,41	9,35	16,82	33,64	25,23	6,54	96,40
	>0,3	0,00	50,00	0,00	25,00	25,00	0,00	3,60
Grožđe	<0,01	8,00	10,00	17,00	33,00	26,00	6,00	90,09
	0,01-0,3	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,90
	>0,3	10,00	20,00	10,00	30,00	20,00	10,00	9,01

Tablica 34. Udio promatrane populacije prema dobnim skupinama za negativnu (<0,01 FIU/mL), graničnu (0,01-0,3 FIU/mL) i pozitivnu senzibilizaciju (>0,3 FIU/mL) za kategoriju povrće i začini

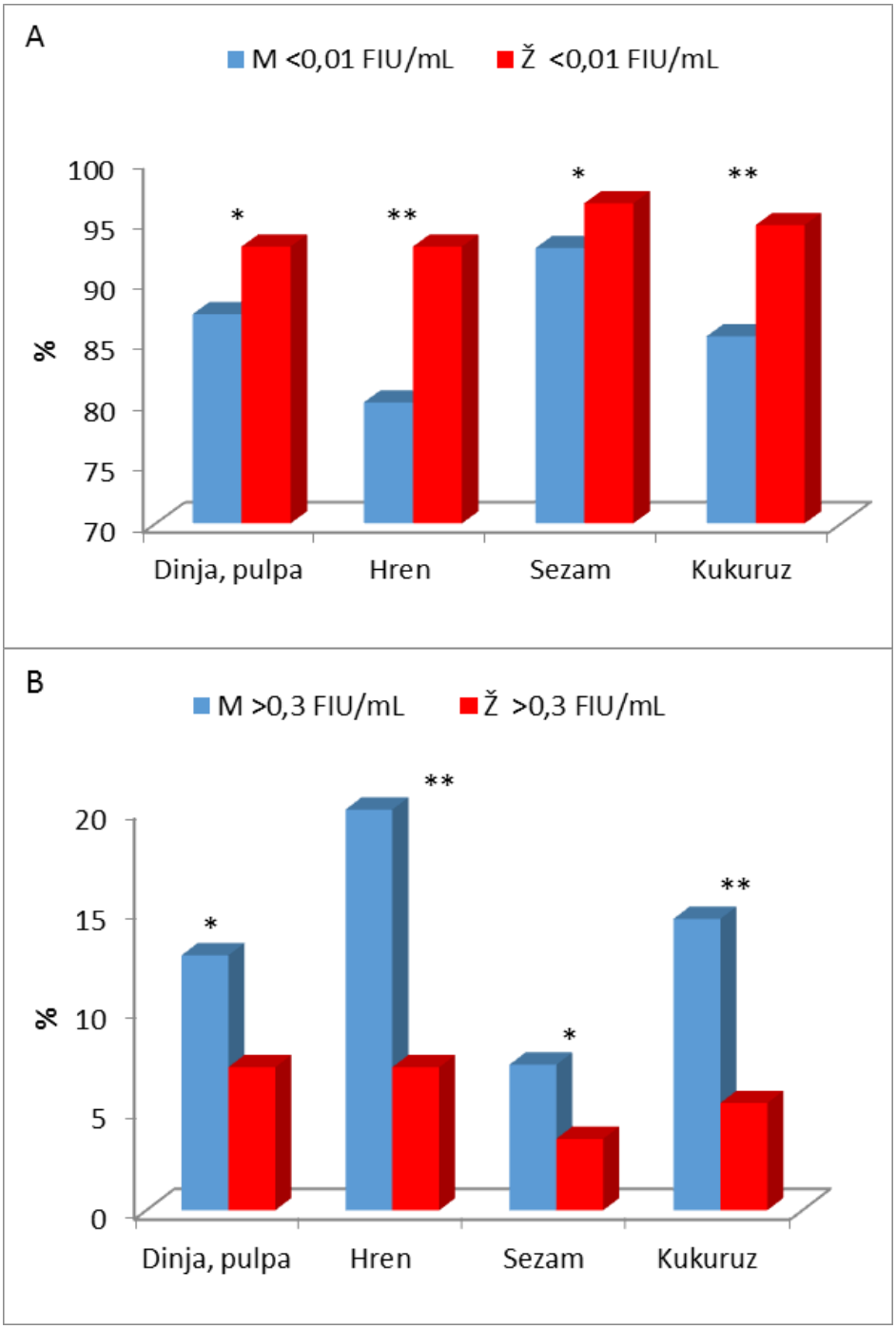
	FIU/mL	Dob (godine)						Ukupno
		<3	3-6	6-18	18-45	45-65	65+	
Luk	<0,01	7,84	10,78	15,69	32,35	27,45	5,88	91,89
	>0,3	11,11	11,11	22,22	44,44	0,00	11,11	8,11
Patlidžan	<0,01	6,52	8,70	16,30	34,78	27,17	6,52	82,88
	0,01-0,3	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,90
	>0,3	16,67	22,22	16,67	27,78	11,11	5,56	16,22
Krumpir	<0,01	5,94	10,89	15,84	34,65	26,73	5,94	90,99
	>0,3	30,00	10,00	20,00	20,00	10,00	10,00	9,01
Poriluk	<0,01	7,45	8,51	17,02	34,04	27,66	5,32	84,68
	>0,3	11,76	23,53	11,76	29,41	11,76	11,76	15,32
Češnjak	<0,01	8,00	8,00	17,00	34,00	27,00	6,00	90,09
	>0,3	9,09	36,36	9,09	27,27	9,09	9,09	9,91
Celer	<0,01	8,33	8,33	17,71	32,29	27,08	6,25	86,49
	>0,3	6,67	26,67	6,67	40,00	13,33	6,67	13,51
Šparoga	<0,01	7,14	9,18	16,33	33,67	27,55	6,12	88,29
	>0,3	15,38	23,08	15,38	30,77	7,69	7,69	11,71
Hren	<0,01	7,29	10,42	16,67	31,25	27,08	7,29	86,49
	>0,3	13,33	13,33	13,33	46,67	13,33	0,00	13,51
Krastavac	<0,01	8,25	8,25	17,53	34,02	25,77	6,19	87,39
	>0,3	7,14	28,57	7,14	28,57	21,43	7,14	12,61
Mrkva	<0,01	9,09	10,10	17,17	31,31	26,26	6,06	89,19
	>0,3	0,00	16,67	8,33	50,00	16,67	8,33	10,81
Komorač	<0,01	6,38	9,57	17,02	34,04	26,60	6,38	84,68
	>0,3	17,65	17,65	11,76	29,41	17,65	5,88	15,32
Rajčica	<0,01	7,29	8,33	17,71	34,38	26,04	6,25	86,49
	>0,3	13,33	26,67	6,67	26,67	20,00	6,67	13,51
Špinat	<0,01	8,00	8,00	17,00	33,00	27,00	7,00	90,09
	>0,3	9,09	36,36	9,09	36,36	9,09	0,00	9,91
Sezam	<0,01	8,57	9,52	16,19	33,33	25,71	6,67	94,59
	>0,3	0,00	33,33	16,67	33,33	16,67	0,00	5,41
Senf	<0,01	8,33	11,11	16,67	32,41	25,00	6,48	97,30
	>0,3	0,00	0,00	0,00	66,67	33,33	0,00	2,70

Tablica 35. Udio promatrane populacije prema dobnim skupinama za negativnu (<0,01 FIU/mL), graničnu (0,01-0,3 FIU/mL) i pozitivnu senzibilizaciju (>0,3 FIU/mL) za kategoriju mahunarke, žitarice i orašasti plodovi

	FIU/mL	Dob (godine)						Ukupno
		<3	3-6	6-18	18-45	45-65	65+	
Slanutak	<0,01	5,15	10,31	17,53	32,99	27,84	6,19	87,39
	>0,3	28,57	14,29	7,14	35,71	7,14	7,14	12,61
Soja	<0,01	6,06	9,09	17,17	33,33	27,27	7,07	89,19
	>0,3	25,00	25,00	8,33	33,33	8,33	0,00	10,81
Leća	<0,01	6,19	10,31	16,49	31,96	27,84	7,22	87,39
	>0,3	21,43	14,29	14,29	42,86	7,14	0,00	12,61
Heljda	<0,01	8,25	9,28	16,49	34,02	26,80	5,15	87,39
	>0,3	7,14	21,43	14,29	28,57	14,29	14,29	12,61
Lan	<0,01	7,14	9,18	16,33	33,67	26,53	7,14	88,29
	>0,3	15,38	23,08	15,38	30,77	15,38	0,00	11,71
Kukuruz	<0,01	7,00	9,00	17,00	34,00	26,00	7,00	90,09
	>0,3	18,18	27,27	9,09	27,27	18,18	0,00	9,91
Indijski orah	<0,01	6,60	9,43	16,98	33,96	26,42	6,60	95,50
	>0,3	40,00	40,00	0,00	20,00	0,00	0,00	4,50
Kikiriki	<0,01	5,26	9,47	17,89	32,63	28,42	6,32	85,59
	0,01-0,3	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,90
	>0,3	26,67	20,00	6,67	33,33	6,67	6,67	13,51
Brazilski orah	<0,01	6,67	9,52	16,19	34,29	26,67	6,67	94,59
	0,01-0,3	0,00	50,00	50,00	0,00	0,00	0,00	1,80
	>0,3	50,00	25,00	0,00	25,00	0,00	0,00	3,60

Lješnjak	<0,01	5,94	9,90	17,82	32,67	26,73	6,93	90,99
	0,01-0,3	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,90
	>0,3	33,33	22,22	0,00	33,33	11,11	0,00	8,11
Orah	<0,01	6,12	10,20	17,35	33,67	26,53	6,12	88,29
	>0,3	23,08	15,38	7,69	30,77	15,38	7,69	11,71
Pistacija	<0,01	6,12	9,18	17,35	33,67	27,55	6,12	88,29
	>0,3	23,08	23,08	7,69	30,77	7,69	7,69	11,71
Pinjol	<0,01	9,00	10,00	16,00	33,00	26,00	6,00	90,09
	>0,3	0,00	18,18	18,18	36,36	18,18	9,09	9,91
Badem	<0,01	6,25	9,38	17,71	34,38	26,04	6,25	86,49
	>0,3	20,00	20,00	6,67	26,67	20,00	6,67	13,51

5.1.1. Utvrđivanje značajnosti



Slika 14. Značajnost razlike za ispitivane vrste voća i povrća, prema spolu, za negativnu (A) i pozitivnu (B) senzibilizaciju specifičnog imunoglobulina E (* p<0,05; ** p<0,01)

Tablica 36. Udio populacije sa stupnjem reakcije senzibilizacije (negativno (<0,01 FIU/mL), granično (0,01-0,3 FIU/mL) i pozitivno (>0,3 FIU/mL) na određeno voće, s izračunom značajnih razlika (α=0,05)

		M			Ž		
	<0,1	**0,1-0,3**	**>0,3**	**<0,1**	**0,1-0,3**	**>0,3**	χ^2
Kivi	90,9	0,0	9,1	94,6	0,0	5,4	0,097277
Ananas	90,9	0,0	9,1	94,6	0,0	5,4	0,097277
Rogač	83,6	0,0	16,4	80,4	0,0	19,6	0,409154
Mandarina	89,1	0,0	10,9	83,9	0,0	16,1	0,159841
Dinja, pulpa	87,3	0,0	12,7	92,9	0,0	7,1	0,03013*
Jagoda	83,6	0,0	16,4	82,1	0,0	17,9	0,696569
Jabuka	83,6	0,0	16,4	78,6	0,0	21,4	0,217065
Avokado	85,5	0,0	14,5	85,7	0,0	14,3	0,94083
Marelica	90,9	0,0	9,1	87,5	0,0	12,5	0,302629
Breskva, kora	87,3	0,0	12,7	85,7	0,0	14,3	0,656058
Breskva, pulpa	85,5	0,0	14,5	82,1	0,0	17,9	0,387211
Nar	96,4	0,0	3,6	96,4	0,0	3,6	0,972087
Grožđe	92,7	0,0	7,3	89,3	0,0	10,7	0,265832

M – muškarci, Ž – žene

(zelena polja >15, crvena polja >10-15, * značajna razlika (p<0,05))

Tablica 37. Udio populacije sa stupnjem reakcije senzibilizacije (negativno (<0,01 FIU/mL), granično (0,01-0,3 FIU/mL) i pozitivno (>0,3 FIU/mL) na određeno povrće i začine, s izračunom značajnih razlika (α=0,05)

		M			Ž		
	<0,1	**0,1-0,3**	**>0,3**	**<0,1**	**0,1-0,3**	**>0,3**	χ^2
Luk	90,9	0,0	9,1	92,9	0,0	7,1	0,449404
Patlidžan	83,6	0,0	16,4	82,1	1,8	16,1	0,857005
Krumpir	90,9	0,0	9,1	91,1	0,0	8,9	0,954601
Poriluk	87,3	0,0	12,7	82,1	0,0	17,9	0,180435
Češnjak	92,7	0,0	7,3	87,5	0,0	12,5	0,113974
Celer	87,3	0,0	12,7	85,7	0,0	14,3	0,656058
Hren	80,0	0,0	20,0	92,9	0,0	7,1	$5{,}97 \cdot 10^{-7}$*
Krastavac	87,3	0,0	12,7	87,5	0,0	12,5	0,945212
Mrkva	90,9	0,0	9,1	87,5	0,0	12,5	0,302629
Komorač gomolj	87,3	0,0	12,7	82,1	0,0	17,9	0,180435
Rajčica	87,3	0,0	12,7	85,7	0,0	14,3	0,656058
Špinat	89,1	0,0	10,9	91,1	0,0	8,9	0,487344
Sezam	92,7	0,0	7,3	96,4	0,0	3,6	0,046099*
Senf	96,4	0,0	3,6	98,2	0,0	1,8	0,162284

M – muškarci, Ž – žene

(zelena polja >15, crvena polja >10-15, * značajna razlika (p<0,05))

Tablica 38. Udio populacije sa stupnjem reakcije senzibilizacije (negativno (<0,01 FIU/mL), granično (0,01-0,3 FIU/mL) i pozitivno (>0,3 FIU/mL), s izračunom značajnih razlika (α=0,05) za kategoriju mahunarke, žitarice i orašasto voće

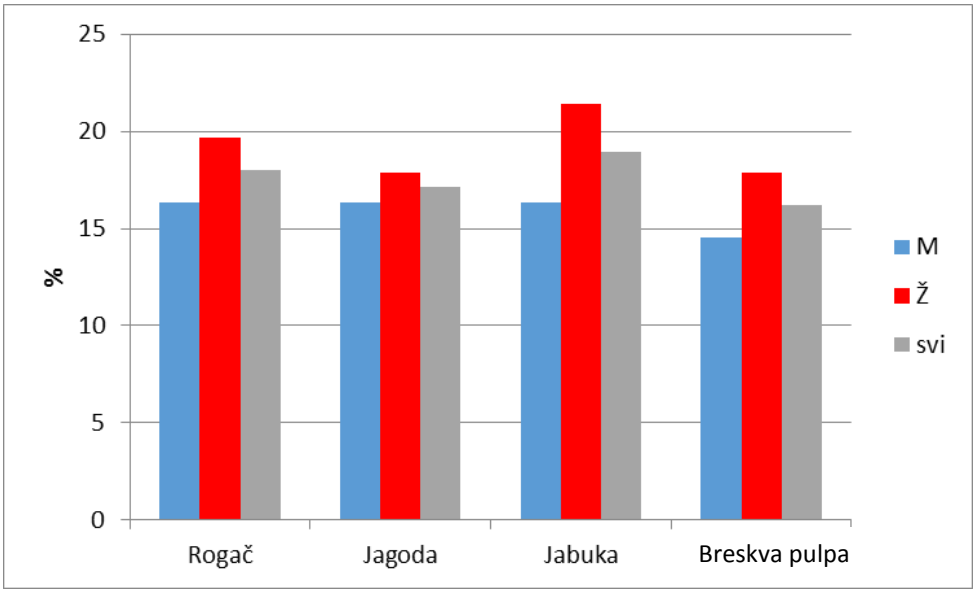
	M			Ž			
	<0,01	**0,01-0,3**	**>0,3**	**<0,01**	**0,01-0,3**	**>0,3**	χ^2
Slanutak	89,1	0,0	10,9	85,7	0,0	14,3	0,33457
Heljda	85,5	0,0	14,5	89,3	0,0	10,7	0,215464
Soja	89,1	0,0	10,9	89,3	0,0	10,7	0,94978
Leća	87,3	0,0	12,7	87,5	0,0	12,5	0,945212
Lan	89,1	0,0	10,9	87,5	0,0	12,5	0,630484
Kukuruz	85,5	0,0	14,5	94,6	0,0	5,4	$4{,}49 \cdot 10^{-5*}$
Indijski orah	96,4	0,0	3,6	94,6	0,0	5,4	0,44474
Kikiriki	85,5	0,0	14,5	85,7	1,8	12,5	0,56244
Brazilski orah	92,7	3,6	3,6	96,4	0,0	3,6	0,705071
Lješnjak	90,9	0,0	9,1	91,1	1,8	7,1	0,465945
Orah	89,1	0,0	10,9	87,5	0,0	12,5	0,630484
Pistacija	87,3	0,0	12,7	89,3	0,0	10,7	0,515155
Pinjol	89,1	0,0	10,9	91,1	0,0	8,9	0,487344
Badem	87,3	0,0	12,7	85,7	0,0	14,3	0,656058

M - muškarci, Ž - žene

(crvena polja >10-15, * značajna razlika (p<0,05))

Tablica 39. Srednje vrijednosti reakcija senzibilizacije za cijelu populaciju, neovisno o dobi i spolu, za kategoriju voće

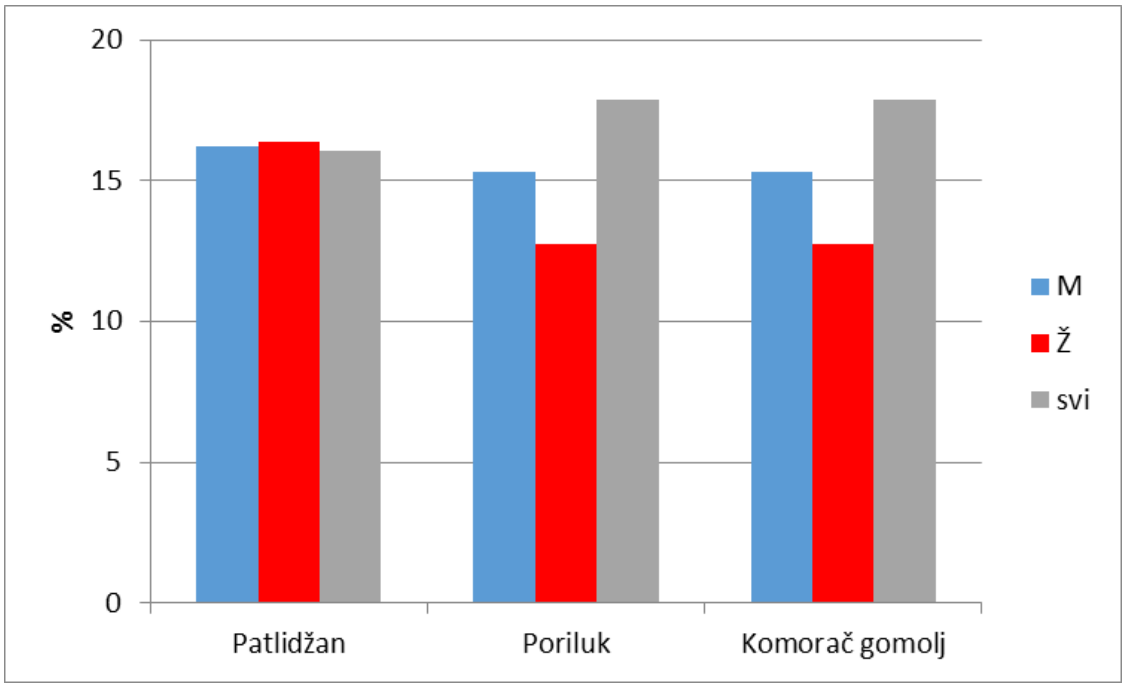
	<0,01	0,01-0,3	>0,3
Kivi	92,79	0,00	7,21
Ananas	92,79	0,00	7,21
Rogač	81,98	0,00	18,02
Mandarina	86,49	0,00	13,51
Dinja, pulpa	90,09	0,00	9,91
Jagoda	82,88	0,00	17,12
Jabuka	81,08	0,00	18,92
Avokado	85,59	0,00	14,41
Marelica	89,19	0,00	10,81
Breskva, kora	86,49	0,00	13,51
Breskva, pulpa	83,78	0,00	16,22
Nar	96,40	0,00	3,60
Grožđe	90,99	0,00	9,01



Slika 15. Voće za koje je koncentracija specifičnog imunoglobulina E bila pozitivna za više od 15 % populacije

Tablica 40. Srednje vrijednosti reakcije senzibilizacije za cijelu populaciju, neovisno o dobi i spolu, za kategoriju povrće i začini

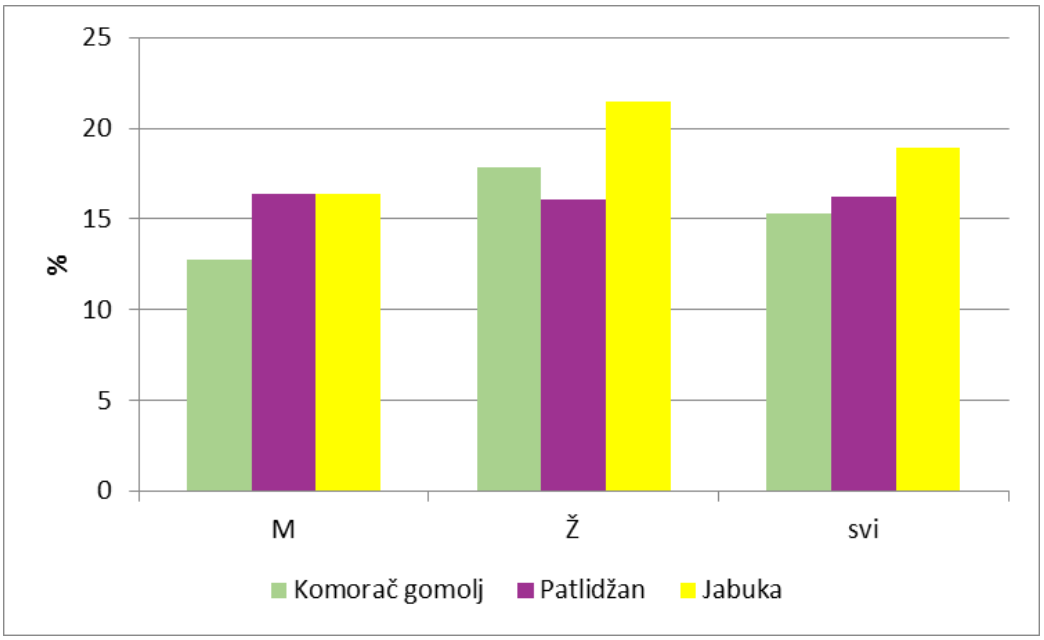
	<0,01	**0,01-0,3**	**>0,3**
Luk	91,89	0,00	8,11
Patlidžan	82,88	0,90	16,22
Krumpir	90,99	0,00	9,01
Poriluk	84,68	0,00	15,32
Češnjak	90,09	0,00	9,91
Celer	86,49	0,00	13,51
Šparoga	88,29	0,00	11,71
Hren	86,49	0,00	13,51
Krastavac	87,39	0,00	12,61
Mrkva	89,19	0,00	10,81
Komorač, gomolj	84,68	0,00	15,32
Rajčica	86,49	0,00	13,51
Špinat	90,09	0,00	9,91
Sezam	94,59	0,00	5,41
Senf	97,30	0,00	2,70



Slika 16. Povrće za koje je koncentracija specifičnog imunoglobulina E bila pozitivna za više od 15 % populacije

Tablica 41. Srednje vrijednosti reakcija senzibilizacije za cijelu populaciju, neovisno o dobi i spolu, za kategoriju mahunarke, žitarice i orašasto voće

	<0,01	**0,01-0,3**	**>0,3**
Slanutak	87,39	0,00	12,61
Heljda	87,39	0,00	12,61
Soja	89,19	0,00	10,81
Leća	87,39	0,00	12,61
Lan	88,29	0,00	11,71
Kukuruz	90,09	0,00	9,91
Kikiriki	85,59	0,90	13,51
Brazilski orah	94,59	1,80	3,60
Lješnjak	90,99	0,90	8,11
Orah	88,29	0,00	11,71
Pistacija	88,29	0,00	11,71
Pinjol	90,09	0,00	9,91
Badem	86,49	0,00	13,51



Slika 17. Izdvojena učestalost pozitivne koncentracije specifičnog imunoglobulina E (> 0,3 FIU/mL) u cijeloj populaciji, za komorač, patlidžan i jabuku

Tablica 42. Učestalost senzibilizacije na najznačajnije alergene prema dobi za mušku populaciju

Dob	Jabuka		Komorač		Patlidžan	
	%		%		%	
	u svojoj populaciji (iste dobi)	u ukupnoj populaciji*	u svojoj populaciji (iste dobi)	u ukupnoj populaciji	u svojoj populaciji (iste dobi)	u ukupnoj populaciji
0-3	20,0	11,1	20,0	14,3	20,0	11,1
3-6	25,0	22,2	12,5	14,3	25,0	22,2
6-18	11,1	11,1	0,0	0,0	22,2	22,2
18-45	16,7	33,3	16,7	42,9	11,1	22,2
45-65	15,4	22,2	15,4	28,6	15,4	22,2
65+	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

*ukupna populacija (broj onih koji su imali pozitivnu koncentraciju specifičnog imunoglobulina E (> 0,3 FIU/mL)

Tablica 43. Učestalost senzibilizacije na najznačajnije alergene prema dobi za žensku populaciju

Dob	Jabuka		Komorač		Patlidžan	
	%		%		%	
	u svojoj populaciji (iste dobi)	u ukupnoj populaciji*	u svojoj populaciji (iste dobi)	u ukupnoj populaciji	u svojoj populaciji (iste dobi)	u ukupnoj populaciji
0-3	50,0	16,7	50,0	20,0	50,0	22,2
3-6	50,0	16,7	50,0	20,0	50,0	22,2
6-18	11,1	8,3	22,2	20,0	11,1	11,1
18-45	26,4	41,7	10,5	20,0	15,8	33,3
45-65	0,0	0,0	6,6	10,0	0,0	0,0
65+	40,0	16,7	20,0	10,0	20,0	11,1

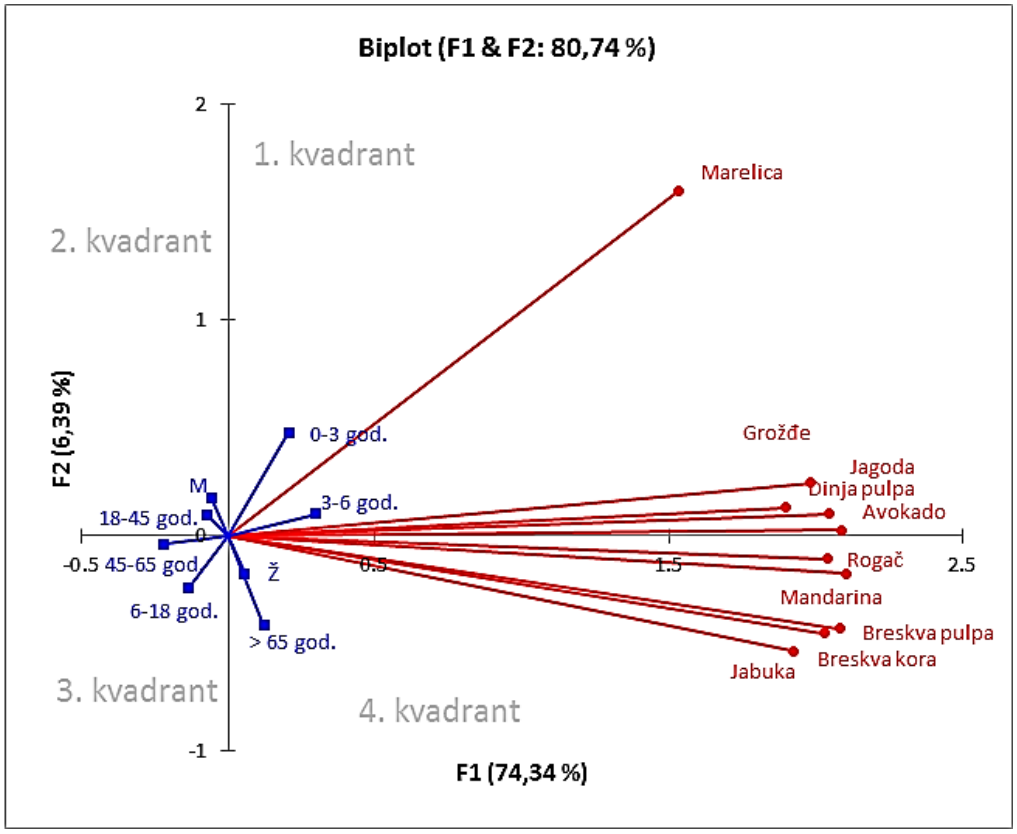
*ukupna populacija (broj onih koji su imali pozitivnu koncentraciju specifičnog imunoglobulina E (> 0,3 FIU/mL))

5.1.2. Multivarijatna analiza

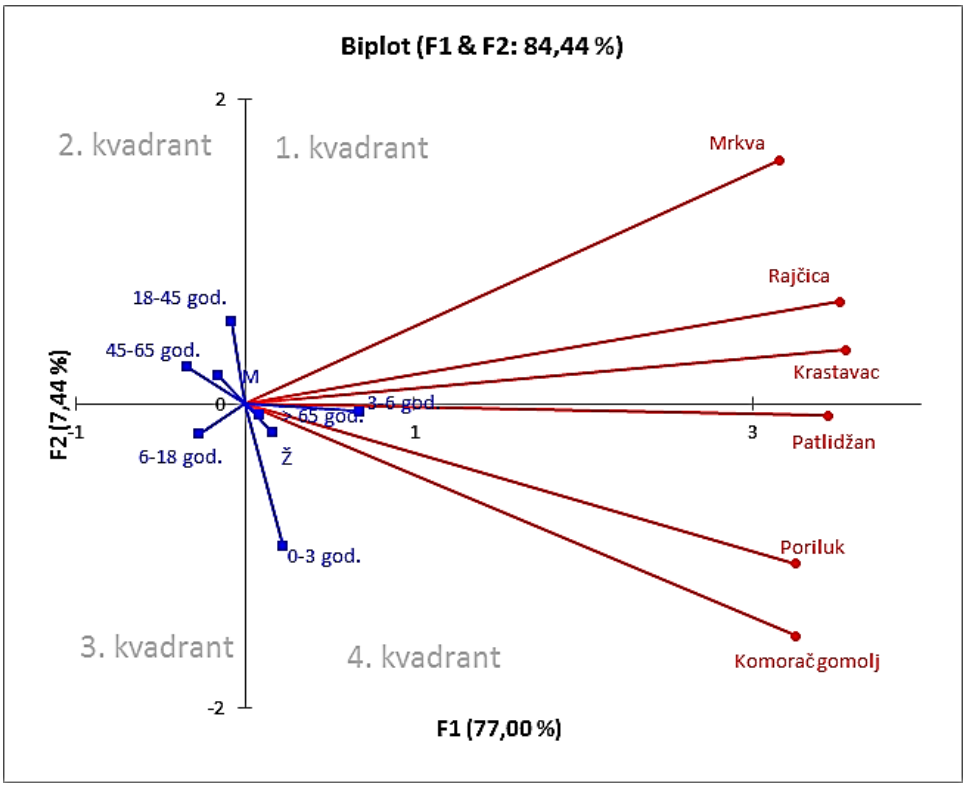
Tablica 44. Korelacija varijabli nakon Verimax rotacije (crveno obojana polja pokazuju vrijednosti veće od 0,7 koje se smatraju značajnim korelacijama u pojedinoj komponenti (D1 i D2)

	D1	D2
Kivi	0,5655	0,4064
Luk	0,5468	0,4041
Patlidžan	0,7050	0,5050
Krumpir	0,5160	0,2982
Poriluk	0,7152	0,4757
Češnjak	0,6046	0,3891
Ananas	0,6490	0,2452
Indijski orah	-0,0193	0,8000
Celer	0,6126	0,5008
Kikiriki	0,4672	0,7555
Šparoga	0,6537	0,6140
Brazilski orah	-0,0442	0,6994
Hren	0,4839	0,6150
Rogač	0,7283	0,4546
Slanutak	0,4234	0,7893
Mandarina	0,8599	0,2880
Lješnjak	0,3860	0,6648
Dinja, pulpa	0,7095	0,4494
Mrkva	0,7042	0,2775
Heljda	0,6854	0,4913
Komorač, gomolj	0,8231	0,2545
Jagoda	0,7666	0,3949
Soja	0,3777	0,6330
Orah	0,7822	0,3099
Leća	0,4147	0,7493
Lan	0,6551	0,3973
Jabuka	0,7289	0,4126
Avokado	0,8446	0,3358
Pistacija	0,3958	0,8149
Marelica	0,8771	0,1083
Pinjol	0,7768	0,3983
Badem	0,6344	0,5574
Breskva, kora	0,8957	0,1578
Breskva, pulpa	0,9001	0,1772
Nar	0,4440	0,4009
Sezam	0,5040	0,4214
Senf	0,4013	0,3561
Rajčica	0,7638	0,3703
Špinat	0,6614	0,5442
Grožđe	0,8213	0,2437
Kukuruz	0,6243	0,5994

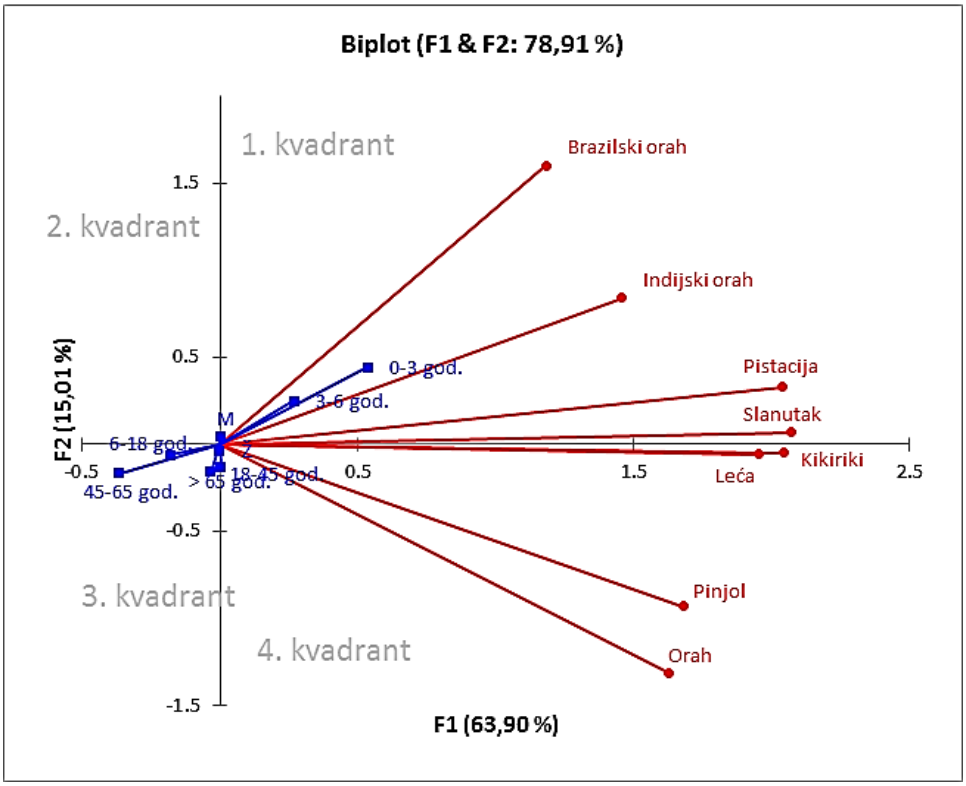
Primijenjeni su alati multivarijatne analize, faktorska analiza i analiza glavnih komponenata (engl. principal component analysis, PCA) kako bi se istovremeno promotrio utjecaj dobi i spola na određenu skupinu namirnica. Radi preglednosti, prikazi analize glavnih komponenata razvrstani su prema 3 promatrane kategorije: voće, povrće i začini, te mahunarke, žitarice i orašasto voće.



Slika 18. Analiza glavnih komponenata za alergene iz skupine voće

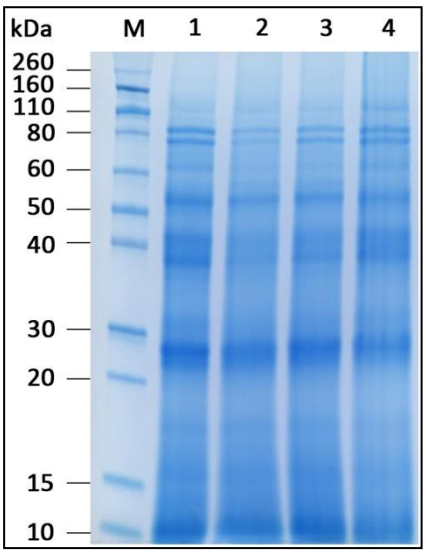


Slika 19. Analiza glavnih komponenata za alergene iz skupine povrće i začini

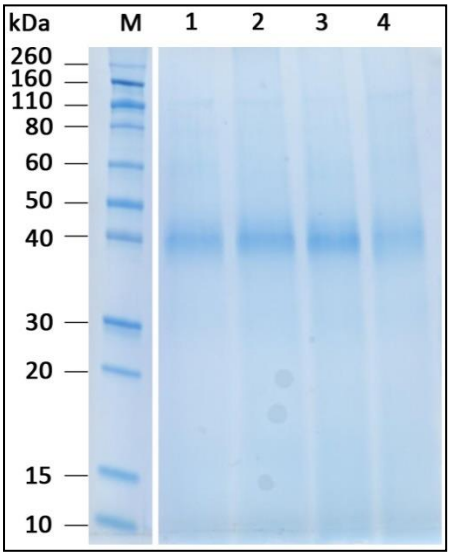


Slika 20. Analiza glavnih komponenata za alergene iz skupine mahunarke, žitarice i orašasto voće

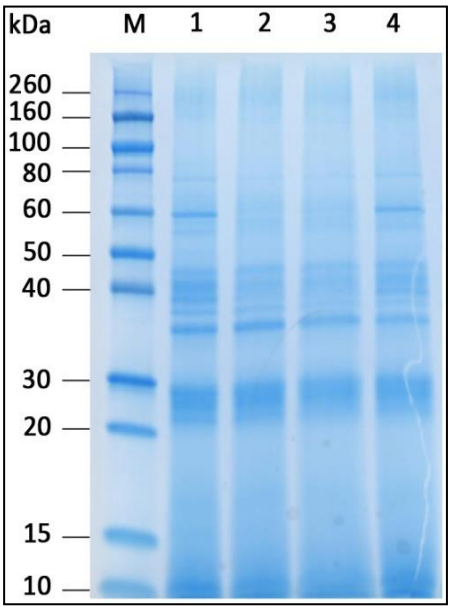
5.2. Elektroforetska analiza proteinskih ekstrakata



Slika 21. Elektroforeza proteinskog ekstrakta komorača. M: standard molekulskih masa; 1: neobrađeni proteinski ekstrakt; 2) proteinski ekstrakt obrađen u ultrazvučnoj kupelji; 3) proteinski ekstrakt obrađen ultrazvučnom sondom; 4) proteinski ekstrakt izložen temperaturi od 95 °C

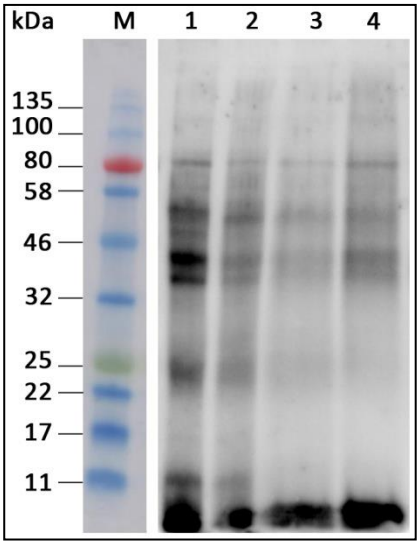


Slika 22. Elektroforeza proteinskog ekstrakta patlidžana. M: standard molekulskih masa; 1: neobrađeni proteinski ekstrakt; 2) proteinski ekstrakt obrađen ultrazvučnom sondom; 3) proteinski ekstrakt obrađen u ultrazvučnoj kupelji; 4) proteinski ekstrakt izložen temperaturi od 95 °C

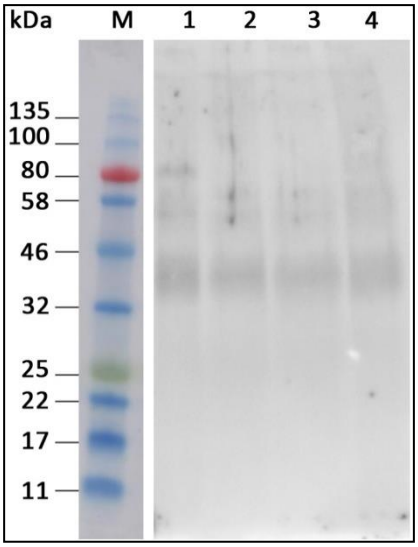


Slika 23. Elektroforeza proteinskog ekstrakta jabuke. M: standard molekulskih masa; 1: neobrađeni proteinski ekstrakt; 2) proteinski ekstrakt obrađen u ultrazvučnoj kupelji; 3) proteinski ekstrakt obrađen ultrazvučnom sondom; 4) proteinski ekstrakt izložen temperaturi od 95 °C

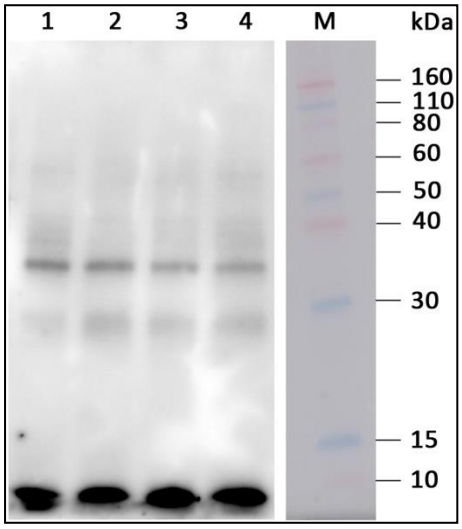
5.3. Imunokemijska detekcija alergena Western blotom



Slika 24. Western blot detekcija proteina komorača. M: standard molekulskih masa; 1: neobrađeni proteinski ekstrakt; 2) proteinski ekstrakt obrađen u ultrazvučnoj kupelji; 3) proteinski ekstrakt obrađen ultrazvučnom sondom; 4) proteinski ekstrakt izložen temperaturi od 95 °C



Slika 25. Western blot detekcija proteina patlidžana. M: standard molekulskih masa; 1: neobrađeni proteinski ekstrakt; 2) proteinski ekstrakt obrađen ultrazvučnom sondom; 3) proteinski ekstrakt obrađen ultrazvučnom kupelji; 4) proteinski ekstrakt izložen temperaturi od 95 °C

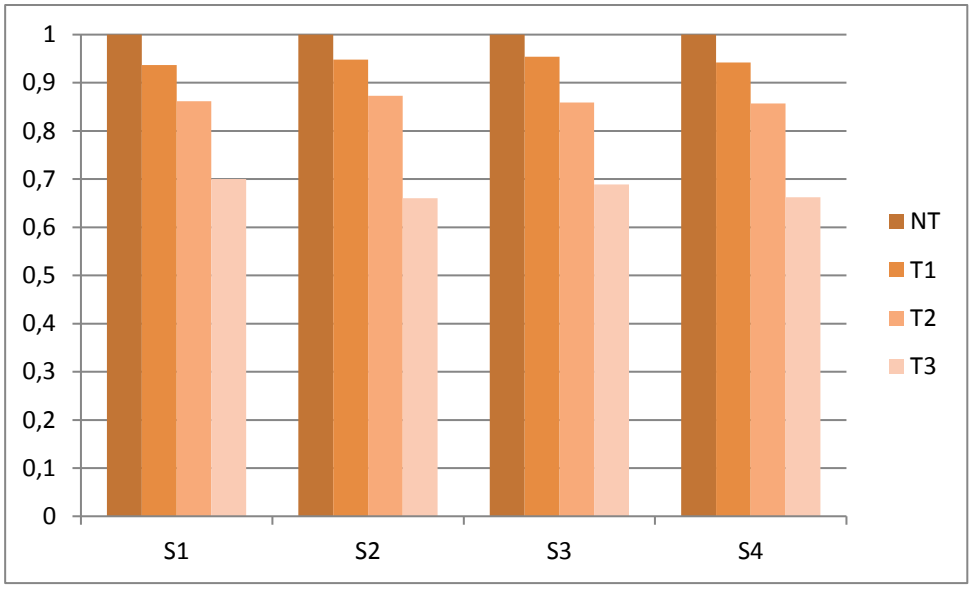


Slika 26. Western blot detekcija proteina jabuke. M: standard molekulskih masa; 1: neobrađeni proteinski ekstrakt; 2) proteinski ekstrakt obrađen u ultrazvučnoj kupelji; 3) proteinski ekstrakt obrađen ultrazvučnom sondom; 4) proteinski ekstrakt izložen temperaturi od 95 °C

5.4. Imunokemijska detekcija alergenih proteina metodom ELISA

Tablica 45. Relativni udjeli apsorbancije tretiranih ekstrakata proteina komorača naspram neobrađenom uzorku. S1-S4 – serumi četiriju ispitanika alergičnih na komorač; NT – neobrađen proteinski ekstrakt; T1 – proteinski ekstrakt obrađen u ultrazvučnoj kupelji; T2 – proteinski ekstrakt obrađen ultrazvučnom sondom; T3 – proteinski ekstrakt izložen temperaturi od 95 °C

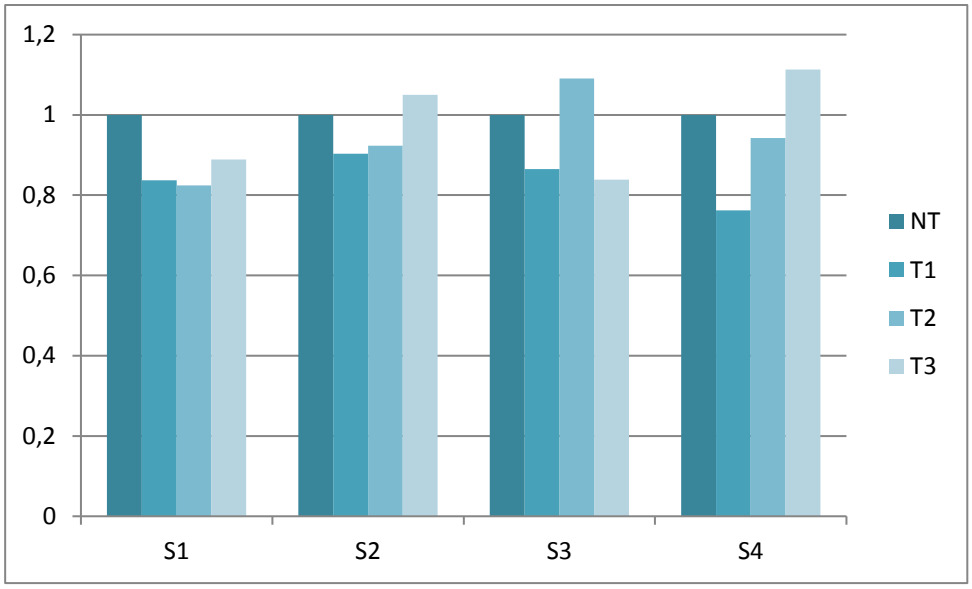
	S1	S2	S3	S4
NT	1	1	1	1
T1	0,937±0,023	0,948±0,037	0,954±0,063	0,942±0,008
T2	0,862±0,066	0,873±0,015	0,859±0,015	0,857±0,001
T3	0,700±0062	0,660±0,002	0,689±0,022	0,662±0,027



Slika 27. Relativni udjeli apsorbancije obrađenih ekstrakata proteina komorača naspram neobrađenom uzorku. S1-S4 – serumi četiriju ispitanika alergičnih na komorač; NT – neobrađeni proteinski ekstrakt; T1 – proteinski ekstrakt obrađen ultrazvučnom kupelji; T2 – proteinski ekstrakt obrađen ultrazvučnom sondom; T3 – proteinski ekstrakt izložen temperaturi od 95 °C

Tablica 46. Relativni udjeli apsorbancije obrađenih ekstrakata proteina patlidžana naspram neobrađenom uzorku. S1-S4 – serumi četiriju ispitanika alergičnih na komorač; NT – neobrađeni proteinski ekstrakt; T1 – proteinski ekstrakt obrađen ultrazvučnom sondom; T2 – proteinski ekstrakt obrađen ultrazvučnom kupelji; T3 – proteinski ekstrakt izložen temperaturi od 95 °C

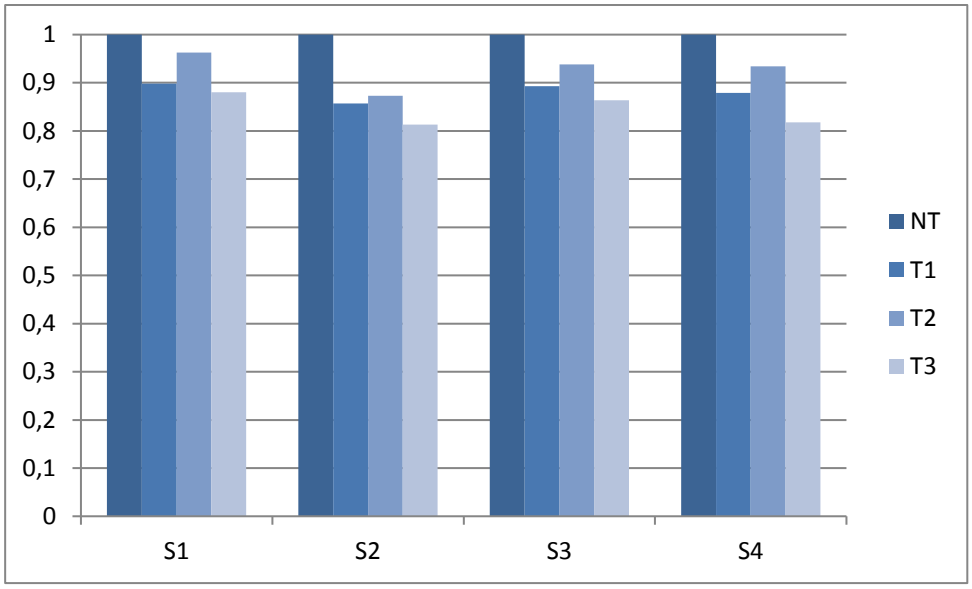
	S1	S2	S3	S4
NT	1	1	1	1
T1	0,837±0,067	0,903±0,053	0,865±0,131	0,762±0,152
T2	0,824±0,029	0,923±0,203	1,091±0,088	0,942±0,090
T3	0,889±0,034	1,050±0,041	0,839±0,154	1,113±0,444



Slika 28. Relativni udjeli apsorbancije obrađenih ekstrakata proteina patlidžana naspram neobrađenom uzorku. S1-S4 – serumi četiriju ispitanika alergičnih na komorač; NT – neobrađeni proteinski ekstrakt; T1 – proteinski ekstrakt obrađen ultrazvučnom sondom; T2 – proteinski ekstrakt obrađen u ultrazvučnoj kupelji; T3 – proteinski ekstrakt izložen temperaturi od 95 °C

Tablica 47. Relativni udjeli apsorbancije obrađenih ekstrakata proteina jabuke naspram neobrađenom uzorku. S1-S4 – serumi četiriju ispitanika alergičnih na komorač; NT – neobrađeni proteinski ekstrakt; T1 – proteinski ekstrakt obrađen u ultrazvučnoj kupelji; T2 – proteinski ekstrakt tretiran ultrazvučnom sondom; T3 – proteinski ekstrakt izložen temperaturi od 95 °C

	S1	S2	S3	S4
NT	1	1	1	1
T1	0,898±0,028	0,857±0,033	0,893±0,005	0,879±0,028
T2	0,963±0,006	0,873±0,023	0,938±0,021	0,934±0,016
T3	0,880±0,011	0,813±0,007	0,864±0,024	0,818±0,041



Slika 29. Relativni udjeli apsorbancije obrađenih ekstrakata proteina jabuke naspram neobrađenom uzorku. S1-S4 – serumi četiriju ispitanika alergičnih na komorač; NT – neobrađeni proteinski ekstrakt; T1 – proteinski ekstrakt obrađen u ultrazvučnoj kupelji; T2 – proteinski ekstrakt obrađen ultrazvučnom sondom; T3 – proteinski ekstrakt izložen temperaturi od 95 °C

6. RASPRAVA

Brojna istraživanja vezana su za prevalenciju alergijskih reakcija i preosjetljivosti na hranu. Međutim, u velikoj mjeri pouzdanost tih procjena i kako se one odražavaju na stvarnu zastupljenost alergijskih reakcija na hranu unutar opće populacije ovise o kriterijima dijagnosticiranja kao i o izboru proučavane populacije. U ovom radu praćena je prevalencija slučajnim uzorkovanjem osoba (n=111) za koje je testirana koncentracija specifičnog imunoglobulina E (FIU/mL) za određene vrste voća i povrća. Rezultati su promatrani prema ukupnoj populacijskoj skupini te prema spolu (n_M=55; $n_Ž$=56), u omjeru koji odgovara omjeru muške i ženske populacije u RH (49 % : 51 %). Na temelju rezultata presjeka dobi i spola, proteinski ekstrakti koji su pokazali najveći alergijski potencijal su proteinski ekstrakti jabuke, komorača i patlidžana.

6.1. Distribucija ispitanika

Distribucija ispitanika prema dobi prikazana je Slikom 13. Frekvencija je podijeljena u 6 razreda i to na sljedeći način: (i) od 0-3 godine, (ii) 3-6 godina, (iii) 6-18 godina, (iv) 18-45 godina, (v) 45-65 godina, te (vi) osobe starije od 65 godina (65+). Navedeni razredi su izdvojeni kako bi se promatrala djeca jasličke dobi, vrtićke te školske dobi, radno aktivna populacija koja je mlađa (18-45 godina) te starija radno aktivna populaciju i populacija umirovljenika (> 65 godina). Distribucija prema navedenim razredima prikazana je prema spolu i za cjelokupnu populaciju. Sve tri krivulje pokazuju normalnost distribucije, a srednje vrijednosti dobi s pripadnim rasponom (minimum, maksimum) i standardnom devijacijom, prikazane su u Tablici 11. Kod prikaza distribucijske krivulje za mušku populaciju (plava krivulja, Slika 13) vidljiv je netipičan oblik početka krivulje, jer je dječaka u dobi od 3-6 godina bilo gotovo jednako kao dječaka u frekvencijskom razredu dobi od 6-18 godina. Od ukupnog broja ispitanika (muškaraca i žena) n=111, više je bilo žena n=56, nego muškaraca n=55, što je u skladu sa udjelom spolova u ukupnom stanovništvu RH (DZS, 2018). Najveći broj ženskih ispitanika nalazi se u rasponu od 45-65 godina, a nešto malo manje muškaraca u istom tom intervalu, što se i vidi iz izračuna te srednje vrijednosti koja za muškarce iznosi 29,04, a za žene 34,96. Prosječna dob svih ispitanika bila je 32 godine. Maksimalan broj ženskih ispitanika u najvećem intervalu ispitivanosti je 82, a muškaraca 78. Prema statističkoj obradi žene su izloženije utjecajima ispitivanih alergena, što je u skladu s istraživanjem

Schafer i suradnika (2001) koji su utvrdili da je kod odraslih, alergija na hranu češća u žena nego u muškaraca.

Kako bi se potvrdila hipoteza (H_0) kako su podaci normalno distribuirani, korištena su 4 testa: Shapiro-Wilk, Anderson-Darling, Lillefors i Jarque-Bera test (Petz, 2007). Metodama se ispituje je li H_0 hipoteza potvrđena (p vrijednost će biti veća od 0,05), ili vrijedi alternativna hipoteza, H_1: varijable iz promatranog skupa podataka ne prate normalnu distribuciju (tada je $p<0,05$). Podaci za sva tri skupa (muškarci, žene i cijela populacija) prikazani su u Tablici 16. Niti prema jednom od navedena 4 testa nije utvrđena p-vrijednost manja od 0,05 te se time potvrđuje nulta-hipoteza kako se radi o dobi koja je neovisno o spolu, normalno distribuirana.

Također su izračunati momenti centralne tendencije za navedene distribucijske krivulje te su izračunati momenti od prvog do četvrtog reda (Gajdoš Kljusurić, 2009). Tako moment prvog reda predstavlja aritmetička sredina, moment drugog reda je varijanca u promatranom skupu podataka, dok će treći moment (koeficijent asimetrije) i četvrti moment (koeficijent spljoštenosti) dati dodatne informacije o dobnoj distribuciji ispitanika (Tablica 17). Koristeći parametre navedene u Tablicama 9 i 10, može se procijeniti asimetrija i spljoštenost (Vranić, 1958). Tako se za asimetriju krivulje za mušku populaciju utvrđuje srednja asimetrija ($\alpha 3=0,29$), iako se na Slici 13 značajnost asimetrije ne zamjećuje. Distribucijske krivulje za žene i cijeli populacijski skup pokazale su slabu asimetriju, obzirom da je njihova vrijednost za $\alpha 3$ u rasponu od 0,1-0,25 (Tablica 9). Spljoštenost krivulje potvrđena je prema Tablici 10, jer su svi parametri $\alpha 4 < 3$, a razlog tome je velika varijanca, a time i standardna devijacija, tj. velika je raspršenost oko srednje vrijednosti za sve tri krivulje (Tablica 14).

Promatrani parametri koji predstavljaju sadržaj specifičnog imunoglobulina E su kvantitativni te su prikazani prema tri kategorije, a to su: **voće** (uključuje: kivi, ananas, rogač, mandarina, pulpu dinje, jagodu, jabuku, avokado, marelicu, koru i pulpu breskve, nar i grožđe); **povrće i začini** (uključuje: luk, patlidžan, krumpir, poriluk, češnjak, celer, šparogu, hren, krastavac, mrkvu, gomolj komorača, rajčicu, špinat, sezam i senf) te **mahunarke, žitarice i orašasto voće** (uključuje: slanutak, soju, leću, heljdu, lan, kukuruz, indijski orah, kikiriki, brazilski orah, lješnjak, orah, pistaciju, pinjol i badem).

Tablice 15, 16 i 17 pokazuju srednje vrijednosti s pripadnim standardnim devijacijama i rasponima za kategoriju voće za muškarce (Tablica 15), za žene (Tablica 16) i za ukupnu promatranu populaciju (Tablica 17). U muškaraca je najviša vrijednost specifičnog imunoglobulina E kod voća utvrđena za nar (10,99 FIU/mL), dok su kod žena (Tablica 16)

utvrđene iznimno visoke vrijednosti (>100 FIU/mL) specifičnog imunoglobulina E kod sljedećeg voća: kora breskve (160,47 FIU/mL), marelica (131,58 FIU/mL) i grožđe (112,04 FIU/mL). Izrazito visoke vrijednosti kod žena, odražavaju se na prosječan prikaz za promatrani populacijski skup (Tablica 17). Za promatrano voće i vrijednosti specifičnog imunoglobulina E vidljiva je značajna varijacija u zadnjem stupcu u kojem je prikazana srednja vrijednost sa pripadnom standardom devijacijom. Prethodni navodi potvrđuju vrijednosti devijacija koje su veće od srednjih vrijednosti (Tablica 17). Iz tablice vrijednosti specifičnog imunoglobulina E za voće, za cijelu populaciju, vidljivo je kako je najveći broj pokazao pozitivnu reakciju na jabuku (n=21), rogač (n=20) te jagode (n=19) i pulpu breskve (n=18).

Kako bi se dobila jasnija slika o sličnostima i/ili razlikama vrijednosti specifičnog imunoglobulina E na voće, ovisno o spolu, prikazani su rezultati prema kategorijama „negativno“ (koncentracija specifičnog imunoglobulina E ≤ 0,01 FIU/mL), „granično“ (koncentracija specifičnog imunoglobulina E u rasponu od 0,011 do 0,30 FIU/mL) te „pozitivno“ (koncentracija specifičnog imunoglobulina E ≥ 0,3 FIU/mL). Granični prikaz je izostavljen kako bi se ispitala negativna i pozitivna reakcija senzibilizacije, prema spolu te su u skupu pozitivne reakcije (≥ 0,3 FIU/mL utvrđene značajne razlike (Tablice 15 vs. 16) kod žena za mandarine (rasponi: Ž, 1,08-21,92 FIU/mL; M, 0,40-2,33 FIU/mL) i pulpu dinje (rasponi: Ž, 0,81-9,47 FIU/mL; M, 0,83-3,37 FIU/mL). Kao i kod voća, tako je i kod kategorije „povrće i začini“, prezentacija rezultata dana za muškarce (Tablica 19), za žene (Tablica 20) i za promatrani populacijski skup u cijelosti (Tablica 21). U muškaraca (Tablica 19) je najveći raspon utvrđen za sezam, gdje je za 3 ispitanika utvrđen raspon od 0,61-24,56 FIU/mL. Kod žena se ponovno pojavljuju iznimno visoke maksimalne vrijednosti (> 100 FIU/mL) i to za gomolj komorača (155,11 FIU/mL) i rajčicu (139,23 FIU/mL). Promatrajući cijelu populacijsku skupinu, vidljivo je kako je velik broj osoba pokazao pozitivne vrijednosti koncentracije specifičnog imunoglobulina E za patlidžan (n=19) te poriluk i komorač (n=17).

U Tablici 22 je prikazana usporedba frekvencija (udjela) reakcija (negativno, ≤ 0,01 FIU/mL te pozitivno, ≥ 0,3 FIU/mL), muškaraca i žena na promatrano povrće i začine. Značajne razlike (Tablica 22) utvrđene su za pozitivnu reakciju senzibilizacije (> 0,3 FIU/mL) između muškaraca i žena za sljedeće povrće: poriluk (5,13 %), hren (12,86 %) te od začina, sezam (4,7 %).

Za treću kategorije „mahunarke, žitarice i orašasto voće“, prezentacija rezultata dana je također u četiri tablice i to za muškarce (Tablica 23), za žene (Tablica 24), za promatrani

populacijski skup u cijelosti (Tablica 25) i udjeli osoba kod kojih je utvrđena koncentracija specifičnog imunoglobulina E bila negativna ili pozitivna (Tablica 26).

Kod muške populacije (Tablica 23) je najveći broj (n=9, 16 % muškaraca) imalo pozitivnu reakciju senzibilizacije na kikiriki (10,29 ± 16,58 FIU/mL) te na lješnjak sa srednjom vrijednošću od 6,7 FIU/mL (± 13,48 FIU/mL), što je utvrđeno za 9 % ispitanika.

Kod žena je maksimalna koncentracija specifičnog imunoglobulina E utvrđena za kukuruz od 122,92 FIU/mL (25,6 ± 54,41 FIU/mL), a ono što treba istaknuti je kako kod niti jedne od 56 ženskih osoba (Tablica 24) nije utvrđena negativna ili pozitivna koncentracija specifičnog imunoglobulina E na brazilski orah (0 ± 0 FIU/mL), dok je kod njih 14,2 % (n=8) utvrđena pozitivna reakcija na orah (0,33 – 17,67 FIU/mL) i badem (0,32 – 13,71 FIU/mL).

Promatra li se muška i ženska populacija kao jedna cjelina (Tablica 25), tada je najveći broj pokazao pozitivnu reakciju senzibilizacije na kikiriki (14,4 %), badem (13,5 %) te 12,6 % na slanutak, leću i heljdu.

Najznačajnije razlike u frekvenciji koncentracije alergena koji pokazuju negativnu (<0,01 FIU/mL) ili pozitivnu (>0,3 FIU/mL) reakciju za kategoriju mahunarke, žitarice i orašasto voće (Tablica 25) utvrđene su za kukuruz (9,19 %), heljdu (3,84 %) i slanutak (3,38 %). Češću reakciju na kukuruz i heljdu pokazala je muška populacija, a na slanutak ženska populacija (14,29 % vs. 10,91 %).

Za sve dobne skupine promatrane su reakcije senzibilizacije u kategorijama „negativno“ (<0,01 FIU/mL), „granično“ (0,01-0,3 FIU/mL) i „pozitivno“ (>0,3 FIU/mL) za sve tri promatrane kategorije hrane, kod muške populacije za kategoriju voće (Tablica 27), povrće i začine (Tablica 28) i kategoriju mahunarke, žitarice i orašasto voće (Tablica 29). Za svo voće, reakcije su kod muške populacije bile ili pozitivne (>0,3 FIU/mL), ili negativne (<0,01 FIU/mL), osim kod grožđa, gdje je 1,82 % muškaraca pokazalo graničnu reakciju (0,01-0,3 FIU/mL) i to su svi bili u dobi od 18-45 godina (Tablica 27). Pozitivna reakcija na nar je zabilježena kod 50 % populacije u dobi od 3-6 i 45-65 godina. Zanimljiv je i podatak kako su pozitivne reakcije na senf utvrđene kod populacije 18-45 (50 %) i 45-65 godina (50 %), koja predstavlja radno aktivnu populaciju. Na brazilski orah (Tablica 29) graničnu reakciju pokazala je mlađa populacija u dobi od 3-6 i od 6-18 godina (obje skupine 50 %), a pozitivnu, najmlađa muška populacija (100 %) u dobi od 0-6 godina.

Za žensku populaciju (n=56) također je promatrana raspodjela koncentracije specifičnog imunoglobulina E, za sve tri promatrane kategorije hrane, počevši od voća (Tablica 30), povrća i začina (Tablica 31), do mahunarki, žitarica i orašastog voća (Tablica 32). Koncentracije specifičnog imunoglobulina E kod ženske populacije u kategoriji voće, bila je ili negativna ili pozitivna (Tablica 30), dok je kod povrća (Tablica 31) bila granična za patlidžan i to kod žena dobi 45-65 godina (100 %) te u kategoriji orašasto voće za kikiriki i lješnjak, kod žena dobi 18-45 godina (100 %). Žene su najčešće imale pozitivne koncentracije specifičnog imunoglobulina E za jabuku (21,43 %), jagode, breskve i poriluk (17,86 %).

Kada se promatra ukupna praćena populacija (n=111), tada se prikaz udjela koncentracije specifičnog imunoglobulina E opisuje kroz Tablice 33, 34 i 35, gdje su u Tablici 33 prikazane raspodjele za kategoriju voće, u Tablici 34 za kategoriju povrće i začini, a kategorija mahunarke, žitarice i orašasto voće, prikazana je u Tablici 35.

Ako se kod ukupne populacije uzme granica od 15% kao kritičan pokazatelj učestalosti pojave pozitivne koncentracije specifičnog imunoglobulina E (>0,3 FIU/mL) tada se izdvajaju namirnice kao što su jabuka (18,92 %), rogač (18,02 %), jagoda (17,22 %), breskva (16,22 %) (Tablica 33) te patlidžan (16,22 %), poriluk i komorač (15,32 %) (Tablica 35).

6.1.1. Utvrđivanje značajnosti

Slikom 14 prikazan je odnos utvrđene negativne Slika 14A i pozitivne Slika 14 B koncentracije specifičnog imunoglobulina E koji se značajno razlikuju (hren, dinja, sezam i kukuruz). Vrijednosti razlika navedene su u Tablicama 36-38. Značajnost razlika za hren i kukuruz je manja od p vrijednosti 0,01 te su dvije zvjezdice (**) obilježile razliku kada je muška populacija pokazala znatno veće vrijednosti nego ženska populacija (Tablice 36 i 37). Tako je za hren kod 20 % muške populacije ustanovljena pozitivna koncentracija specifičnog imunoglobulina E, a kod žena svega 7,1 % ($\chi^2=5{,}97\cdot10^{-7}$). Za kukuruz, i 14,5 % muške populacije i 5,4 % ženske populacije koja je imala pozitivnu koncentraciju specifičnog imunoglobulina E, ponovno ukazuju na značajne razlike ($\chi^2=4{,}4\cdot10^{-5}$).

Spol ima značajnu ulogu u reakciji senzibilizacije. Tako koncentracija specifičnog imunoglobulina E za sezam i pulpu dinje, gdje su testirane srednje koncentracije specifičnog imunoglobulina E prema spolu na razini značajnosti $P<0{,}05$ ($\chi^2_{sezam}=0{,}046$; $\chi^2_{dinja}=0{,}03$).

Testiranjem razlika (χ^2-test), značajne razlike su utvrđene za kukuruz (χ^2= $4{,}5 \cdot 10^{-5}$), sezam (χ^2=0,0461), pulpu dinje (χ^2=0,03) te za hren (χ^2=$5{,}97 \cdot 10^{-7}$). Reakcije senzibilizacije na određeni alergen prema spolu značajno se razlikuju (χ^2= 0,000257), a alergeni koji se prema spolu značajno razlikuju su: alergeni hrena, pulpe dinje, sezama te kukuruza i za sve navedene vrijednosti >0,3 su učestalije u muškaraca.

Tablicama 36-41 opisan je rezultat udjela populacije (zasebno prema spolu, Tablice 36-38) ili cijela populacija (Tablice 39-41), sa stupnjem reakcije senzibilizacije: negativno (<0,01 FIU/mL), granično (0,01-0,3 FIU/mL) i pozitivno (>0,3 FIU/mL) na istraživane proteinske ekstrakte, s izračunom značajnih razlika korištenjem χ^2 testa (α=0,05).

U Tablici 38, za kategoriju mahunarke, žitarice i orašasto voće, dobiveni rezultati ne pokazuju nikakve razlike ovisno o spolu praćene populacijske skupine.

Tablice koje slijede prikazuju srednje vrijednosti reakcija senzibilizacije za cijelu populaciju, neovisno o dobi i spolu, za kategoriju voće (Tablica 39), povrće i začini (Tablica 40) i mahunarke, žitarice i orašasto voće (Tablica 41).

Na Slikama 15 i 16 su izdvojene vrste iz kategorije voće, povrće i začini kako bi se pokazale razlike ovisno o spolu, za one namirnice za koje je ustanovljeno kako više od 15 % populacije ima pozitivnu koncentraciju specifičnog imunoglobulina E.

Izrazito visoke vrijednosti (>0,3 FIU/mL), za preko 15 % populacije u oba spola, utvrđene su u kategoriji voće za rogač, jagode, jabuke i pulpu breskve (Tablica 39 i Slika 15). U kategoriji povrće i začini, više od 15 % populacije s pozitivnom koncentracijom specifičnog imunoglobulina E uvrđeno je za patlidžan, poriluk i gomolj komorača (Slika 16, Tablica 40). Tablica 41 prikazuje srednje vrijednosti reakcije senzibilizacije na istraživane alergene za cijelu populaciju, neovisno o dobi i spolu, za kategoriju mahunarke, žitarice i orašasto voće i niti jedna namirnica nije pokazala udio viši od 13,51 %.

Izdvojena učestalost pozitivne koncentracije specifičnog imunoglobulina E (> 0,3 FIU/mL) u cijeloj populaciji, za komorač, patlidžan i jabuku, prikazana je Slikom 17. Ona pokazuje kako je na patlidžan značajniju reakciju senzibilizacije pokazala populacija žena, što je i slučaj s jabukom, dok je za patlidžan visok udio za oba spola (> 16 %). Za navedene 3 namirnice (komorač, patlidžan i jabuku) analizirane su vrijednosti prema spolu i dobi kako bi se utvrdila najranjivija skupina.

Za svaku namirnicu može se utvrditi koje su dobne skupine sklonije reakciji senzibilizacije i to je navedeno na primjeru patlidžana za populaciju žena (Ž) i za mušku populaciju (M), Tablice 42 i 43. Izdvojeni su podaci za jabuku, komorač i patlidžan. Za mušku populaciju je distribucija udjela onih koji su imali pozitivnu koncentraciju specifičnog imunoglobulina E (> 0,3 FIU/mL) na jabuku i patlidžan, distribuirana po svim dobnim skupinama osim kod starijih od 65 godina. Promotrimo li udio u cijeloj muškoj populaciji koja je imala pozitivnu koncentraciju specifičnog imunoglobulina E (> 0,3 FIU/mL), tada je jednaka raspodjela u 3-65 godina (22,2 %), dok za komorač dominiraju dvije skupine, ona 18-45 godina (42,9 %) te 45-65 godina (28,6 %), koje po dobi pripadaju radno aktivnoj populaciji.

Kod ženske populacije (Tablica 43), djeca su vrlo osjetljiva skupina, jer je za jabuku, komorač i patlidžan 50 % ispitanica imalo pozitivnu koncentraciju specifičnog imunoglobulina E.

6.1.2. Multivarijatna analiza

Primijenjena je faktorska analiza koja se koristi za promatranje raspodjele, ali i redukciju varijabli (Kurtanjek i Gajdoš Kljusurić, 2014). U ovom radu faktorska analiza korištena je za reduciranje polaznog skupa varijabli (n=42). Kao težinski koeficijent za redukciju uzeta je vrijednost 0,7 za skup faktora 1 i 2. Polazni skup varijabli reduciran je na 24 varijablu i to: patlidžan, rogač, mandarina, pulpa dinja, jagoda, jabuka, avokado, breskva - kora i pulpa, marelica, grožđe, poriluk, krastavac, mrkva, komorač - gomolj, rajčica, indijski orah, kikiriki, brazilski orah, slanutak, leća, orah, pinjol i pistacija. Analiza glavnih komponenata alergena iz skupine voće (Slika 18) jasno pokazuju grupiranje prema spolu gdje su žene pozicionirane u četvrti kvadrant, a muškarci u drugi kvadrant. To grupiranje potvrđuje 80,74 % svih varijacija u promatranom skupu varijabli. Primarne varijable su alergije na određeno voće, a sekundarne su (i) dob, razvrstana u 6 skupina (0-3; 3-6; 6-18; 18-45; 45-65 i > 65 godina) i (ii) spol (muškarci, M; žene, Ž). Grupiranje u isti kvadrant je pokazatelj visokih korelacija između varijabli u tom kvadrantu. Tako je za žene, posebice one koje su starije od 65 godina značajno češće utvrđena pozitivna reakcija senzibilizacije na jabuke, koru i pulpu breskve, te mandarinu i rogač.

Promatrana grupacija povrće i začini je kao značajne varijable zanemarila začine (Tablica 44) te je ostalo šest namirnica: mrkva, rajčica, krastavac, patlidžan, poriluk i gomolj komorača (Slika 19). U ovom skupu podataka je opisano najviše varijacija (84,44 %) sa analizom glavnih komponenata. Izrazito mlade ženske osobe (0-3 i 3-6 godina) te žene starije od 65

godina, imaju izraženije reakcije senzibilizacije na patlidžan, poriluk i gomolj komorača, što je vidljivo po grupaciji u četvrti kvadrant. No, ovdje je dobna skupina 3-6 godina na samoj x-osi, što pokazuje pozitivnu korelaciju te dobi sa svim navedenim namirnicama iz kategorije povrće, koje su se u analizi glavnih komponenata pokazale značajnima (Tablica 44, D1 ili D2 >0,7). Za muškarce se ne može jasno odrediti trend alergija ovisno o spolu, osim pozitivne Pearsonove korelacije (0,0034) na krastavce.

Faktorska analiza nije izdvojila niti jednu žitaricu kao značajnu varijablu (težinski koeficijent >0,7) te su izdvojene dvije mahunarke – leća i slanutak i 6 orašastih plodova (pistacija, pinjol, orah, brazilski i indijski orah te kikiriki). Dob, spol i promatrane varijable alergena iz hrane opisuju 79,91 % svih varijacija u cijelom skupu, što učvršćuje zaključke koji slijede iz navedenog 2D prikaza. U prvom kvadrantu je grupirana dob 3-6 i 0-3 godine, muškarci te varijable brazilski i indijski orah, pistacija i slanutak – to je pokazatelj kako su kod mlade muške populacije (0-6 godina) izraženije reakcije senzibilizacije na namirnice koje su se grupirale u tom kvadrantu, a to su brazilski i indijski orah, pistacija i slanutak. U četvrti kvadrant su se rasporedile reakcije senzibilizacije na kikiriki, pinjol, orah i leću te dob od 18 – 45 godina te su upravo kod te skupine najznačajnije reakcije senzibilizacije na navedenu hranu te Pearsonov koeficijent korelacije za navedenu dob, za slanutak iznosi 0,0192, za leću 0,0768 te za kikiriki, 0,0186. Ne znači da u dobnim skupinama grupiranim u treći kvadrant nema reakcija senzibilizacije, ali nemaju jasan trend, tj. dob kao varijabla nije isključivo značajan faktor.

6.2. Elektroforetska analiza proteinskih ekstrakata

Na temelju svih prethodnih analiza dijagnostičkih testova, odabrani su serumi triju osoba alergičnih na komorač, patlidžan i jabuku, te se pomoću tih seruma korištenjem elektroforetskih i imunokemijskih metoda analizirao utjecaj postupaka obrade na specifičnu interakciju s imunoglobulinima E iz odabranih seruma.

Kako bi se analizirao utjecaj različitih postupaka obrade na stabilnost proteina, proteinski ekstrakti komorača, patlidžana i jabuke su nakon obrade podvrgnuti denaturirajućoj elektroforezi u poliakrilamidnom gelu, kao što je prikazano na Slikama 21-23.

Slika 21 prikazuje da sva tri postupka obrade mijenjaju obrazac proteina komorača u odnosu na netretirani uzorak. Vidljivo je da obrada u ultrazvučnoj kupelji, slično kao i obrada ultrazvučnom sondom dovode do djelomične razgradnje nekoliko proteina približnih

molekulskih masa 80 kDa, 75 kDa, 60 kDa, 42 kDa, 38 kDa, 17 kDa i 15 kDa jer su odgovarajuće vrpce slabijeg intenziteta. Obrada povišenom temperaturom pri 95 °C, djeluje pak na sve proteine podjednako, uzrokujući parcijalnu denaturaciju koja se na gelu očituje kao razmaz, odnosno gubitak oštrine svih proteinskih vrpci.

Kod proteinskog ekstrakta patlidžana (Slika 22) nema tako zamjetnih razlika između tretiranih i netretiranih uzoraka jer u samom početnom materijalu proteinske vrpce nisu jako izražene. Izdvojene su jedino vrpce proteina približne molekulske mase 40 kDa i 110 kDa, koje su sličnog izgleda u netretiranom uzorku i u uzorcima obrađenim ultrazvukom, dok je kao i kod komorača, postupak obrade povišenom temperaturom uzrokovao parcijalnu denaturaciju proteina.

Kod proteinskog ekstrakta jabuke obrada ultrazvukom uzrokovala je djelomičnu razgradnju niza proteina u rasponu molekulskih masa 35 – 80 kDa, pri čemu je nešto izraženiji učinak ultrazvučne sonde, dok obrada pri povišenoj temperaturi nije dovela do zamjetnog učinka (Slika 23).

6.3. Imunokemijska detekcija alergena Western blotom

Utjecaj različitih postupaka obrade na alergenost pojedinačnih proteina iz ekstrakata komorača, patlidžana i jabuke analiziran je Western blotom, pri čemu su imunoglobulini E iz objedinjenog seruma četiriju alergičnih ispitanika stvorili kompleks s proteinskim antigenima u ekstraktima. Interakcija je vizualizirana vezanjem detekcijskog protutijela uz dodatak odgovarajućeg supstrata (Slike 24-26).

U netretiranom proteinskom ekstraktu komorača utvrđena je prisutnost više alergenih proteina širokog raspona molekulskih masa, od manjih oko 9, 11 i 24 kDa, do nekoliko proteina u rasponu molekulskih masa od oko 35 do 80 kDa (Slika 24). Kao posebno jaki alergeni ističu se mali protein približne molekulske mase oko 9 kDa te nešto veći protein od oko 40 kDa. Pastorello i suradnici (2012) identificirali su protein veličine 9 kDa kao glavni antigen kod komorača te pokazali da odgovara proteinu LTP (*engl.* lipid transfer protein). Kao dodatni antigeni istakli su se protein veličine 15 kDa i više proteina u rasponu od 65-75 kDa (Pastorello i sur., 2012). U ovom radu proteini nisu detektirani kao antigeni, no to se može pripisati različitostima među ispitanicima i malom broju ispitanika koji je posljedica rijetke incidencije alergije na komorač. Svi su tretmani smanjili alergenost proteina, što se očituje u slabljenju intenziteta pojedinih vrpci. Posebno je jak utjecaj imao postupak obrade

ultrazvučnom sondom gdje su pojedini alergeni proteini gotovo potpuno izgubili mogućnost vezanja na IgE molekule iz seruma alergičnih ispitanika.

Slika 25 pokazuje da u netretiranom proteinskom ekstraktu patlidžana ima nekoliko slabijih antigena u rasponu molekulskih masa od oko 36 do 80 kDa. Sva tri postupka obrade uzrokovala su gubitak antigenih svojstava proteina približne molekulske mase 80 kDa, dok je učinak na ostale proteine slabije izražen, pri čemu je najmanje djelovala toplinska obrada. U pokusu sa serumima šestero ispitanika iz Indije identificirano je 5 antigena u rasponu od 36 do 71 kDa (Bheemanapalli i sur., 2009). Antigeni detektirani u ovom radu većinom se podudaraju, no ovdje je prisutan dodatni antigen od oko 80 kDa, što se može pripisati kako različitostima među ispitanicima različite genetičke i geografske podloge, tako i malom broju ispitanih uzoraka.

U ekstraktu jabučnih proteina detektiran je jaki antigen niske molekulske mase od oko 9 kDa, malo slabiji antigen približne molekulske mase od oko 35 kDa te nekoliko slabih alergena u rasponu molekulskih masa od oko 28 do 60 kDa. Niti jedan od primijenjenih postupaka obrade nije pokazao veći učinak na promjenu alergenosti proteina jabuke.

6.4. Imunokemijska detekcija alergenih proteina metodom ELISA

Uz uporabu pojedinačnih seruma četiriju alergičnih ispitanika metodom ELISA, ispitan je utjecaj različitih postupaka obrade na alergenost ukupnih proteina u ekstraktima komorača, patlidžana i jabuke.

Rezultati su vrijednosti apsorbancije pri 490 nm nakon detekcije i vizualizacije kompleksa antigen-IgE protutijelo, uz uporabu detekcijskog protutijela konjugiranog peroksidazom iz hrena i pripadnog supstrata. Rezultati su izraženi kao relativne vrijednosti udjela tretiranih uzoraka naspram netretiranom uzorku koji ima proizvoljnu vrijednost 1. Brojčani rezultati uz standardne devijacije prikazani su u Tablicama 45-47. Rezultati su i u grafičkom obliku prikazani zajedno i u relativnim odnosima, da se uoči opći utjecaj pojedinog postupka obrade na imunogenost ukupnih proteina u uzorku te da se stekne uvid u sličnosti, odnosno različitosti prepoznavanja antigena serumima različitih ispitanika (Slike 27-29).

Kao što prikazuju Tablica 45 i Slika 27, svi postupci obrade uzrokovali su smanjenje ukupne imunogenosti proteina komorača, pri čemu najizraženiji učinak ima toplinska obrada pri kojoj dolazi do relativnog smanjenja od oko 30 %. Slijedi postupak obrade ultrazvučnom sondom (smanjenje oko 15 %) te postupak obrade u ultrazvučnoj kupelji koji ima vrlo blagi učinak. Rezultati Western blota dali su slične rezultate, no tamo je pad imunogenosti bio

najizraženiji za postupak obrade ultrazvučnom sondom. Treba uzeti u obzir da ELISA daje rezultate o imunogenosti ukupnih proteina, dok Western blot razlučuje učinak na pojedinačne proteine na temelju kojega se kvantitativno procjenjuje skupni učinak, što nije uvijek dovoljno precizno, stoga kombinacija obiju metoda daje potpuniju sliku. Isto tako, iz rada Pastorello i suradnika (2012) znamo da je glavni antigen komorača protein LTP, stoga se kod različitih postupaka obrade mala razlika antigenosti tog jednog proteina, koja se Western-blotom teže uočava, može različito odraziti na ukupnu imunogenost uzorka koju mjeri ELISA. Rezultati također pokazuju da serumi pojedinačnih ispitanika podjednako reagiraju s proteinima komorača, no čvršću potvrdu o tome trebalo bi dobiti primjenom većeg broja seruma.
Vrijednost ovih rezultata je i u činjenici da glavni antigeni komorača pokazuju križnu reaktivnost s antigenima breskve (Pastorello i sur. 2012; Pastorello i sur. (2013)) pa je moguće da se različitim obradama može smanjiti alergijska reakcija.

Rezultati prikazani u Tablici 46 i na Slici 28 pokazuju velike razlike u prepoznavanju antigena među različitim ispitanicima. Svi postupci obrade uzrokovali su promjene u antigenosti ukupnih proteina patlidžana, no različiti ispitanici u svojim serumima sadrže IgE molekule koje različito reagiraju na pojedine antigene. Tako, primjerice, kod prvog ispitanika svi postupci obrade uzrokuju smanjenje ukupne antigenosti proteina. Kod drugog i četvrtog ispitanika je to izraženo za prva dva postupka obrade, dok toplinska obrada uzrokuje promjene u proteinima koji povećavaju njihovu antigenost, a za trećeg ispitanika antigenost proteina patlidžana povećava obrada u ultrazvučnoj kupelji, dok je preostala dva postupka obrade smanjuju. Kod Western blota taj učinak nije vidljiv jer se za prepoznavanje antigena koristio objedinjeni serum svih četiriju ispitanika. Da bi se stekao bolji uvid u pojedinosti ovog odgovora, trebalo bi pokuse ponoviti na većem broju uzoraka. Hoseini-Alfatemi i suradnici (2015) su proučavali utjecaj toplinske obrade na alergenost proteina patlidžana. Nakon provedene ELISA analize primijetili su da ispitanici imaju visok titar IgE protutijela i na sirove i na kuhane ekstrakte patlidžana što se podudara s rezultatima dobivenim u ovom radu kod drugog i četvrtog ispitanika gdje se antigenost toplinskom obradom čak i povećala. Navedeni autori zatim su napravili imunoblot analizu koja je potvrdila prethodno dobivene rezultate što pokazuje visoku stabilnost proteina patlidžana pri toplinskoj obradi. Iako patlidžan sadrži vrlo malo proteina (~1% na svježoj osnovi), prisutnost velikog broja proteinskih vrpci na SDS-PAGE ukazuje na složenost proteinskog profila patlidžana. Osim toga, Harish Babu i suradnici (2016) ispitivali su i alergenu aktivnost enzima polifenol-oksidaze (PPO) iz patlidžana. U analizi su korištene metode ELISA i imunoblot kojima je po prvi put potvrđena PPO kao novi alergen iz hrane.

Harish Babu i suradnici (2008) su radili na učestalosti alergije na patlidžan i analizirati dobnu i spolnu raspodjelu. Analizirano je ukupno 741 ispitanika, pri čemu je njih 68 (9,2 %) pokazalo neku reakciju preosjetljivosti. Ukupno 32 (4,3 %) ispitanika su imala alergiju, a njih 36 (4,9%) je imalo intoleranciju na patlidžan. Razlika u osjetljivosti na hranu ovisno o spolu je zanimljiva, a sličan se trend u budućnosti može pretpostaviti i za druge namirnice. Zaključno, ova studija otkriva da se alergija na patlidžan javlja u 0,8 % stanovništva, s većom prevalencijom u ženskoj populaciji (4:1).

Rezultati prikazani u Tablici 47 i na Slici 29 pokazuju sličan obrazac za različite ispitanike, pri čemu postupak obrade u ultrazvučnoj kupelji vrlo malo (ispitanik 2) ili gotovo i ne mijenja antigenost proteina jabuke (ispitanici 1, 3 i 4). Učinak je nešto izraženiji za postupak obrade ultrazvučnom sondom, ali i dalje relativno slab, dok je toplinska obrada uzrokovala smanjenje antigenosti od 15-20 %. Western blotom ove male razlike nije bilo moguće precizno kvantificirati, a kao i kod komorača treba uzeti u obzir da se i manje promjene na glavnim alergenima mogu manifestirati kao veći učinak na alergenost ukupnih proteina koju mjeri ELISA. To se posebno vidi na primjeru toplinske obrade, gdje je kod Western blota bilo teško zapaziti razliku između netretiranog i tretiranog uzorka, jer je uslijed denaturacije vjerojatno došlo da manjih promjena antigenosti pojedinačnih proteina, dok je kod metode ELISA to evidentno jer se detektira ukupna antigenost svih proteina zajedno.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Rezultati mjerenja specifičnog IgE-a pokazali su, prema reaktivnosti, visoku razinu senzibilizacije za više od 15 % populacije u oba spola za rogač, jabuke, jagode, pulpu breskve, patlidžan, poriluk i komorač.
2. Razvrstavanje rezultata prema spolu pokazalo je različitu učestalost i raspon alergijskih reakcija na određeno voće i povrće.
3. Značajniji alergijski potencijal patlidžana utvrđen je u žena u dobi od 18 do 45 godina.
4. Značajniji alergijski potencijal jabuke utvrđen je u žena u dobi od 18 do 45 godina.
5. Značajniji alergijski potencijal komorača utvrđen je u muškaraca u dobi od 18 do 45 godina.
6. Alati multivarijatne analize, faktorska analiza i analiza glavnih komponenata pokazali su se vrlo učinkovitima u analizi alergena i parametara kao što je dob i spol. Takav pristup daje detaljniji uvid u problematiku prevalencije alergija na hranu te na koje se dobne skupine treba obratiti posebna pozornost.
7. Obrada ultrazvukom i povišenom temperaturom mijenjaju svojstva i smanjuju alergenost proteina komorača, patlidžana i jabuke uslijed parcijalne denaturacije.
8. Zbog križne reaktivnosti s antigenima iz breskve, obrada komorača ultrazvukom ili povišenom temperaturom mogla bi spriječiti dodatnu alergijsku reakciju kod ljudi alergičnih na breskvu.
9. Da bi se stekao detaljniji uvid u učinke različitih postupaka obrade i raznolikost pojedinačnih alergijskih odgovora, potrebno je analizirati veći broj ispitanika.

8. LITERATURA

Alissa, E. M., Ferns, G.A. (2017) Dietary fruits and vegetables and cardiovascular diseases risk. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57** 9, 1950-1962.

Amlot, P.L., Kemeny, D.M., Zachary, C., Parkes, P., Lessof, M.H. (1987) Oral allergy syndrome (OAS): symptoms of IgE-mediated hypersensitivity to foods. *Clinical Allergy* **17**, 33-42.

Andersen, M.-B.S., Hall, S., Dragsted, L.O. (2011) Identification of European allergy patterns to the allergen families PR-10, LTP, and profilin from Rosaceae fruits. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* **41**(1), 4–19.

Andreas, L. (2009) Allergenicity of Food and Impact of Processing. *Novel Food Processing*, 459-478. CRC Press.

Anugu, A.K. (2009) Effect of Pulsed UV Lights and Pulsed Electric Fields on Selected Isolated Milk Proteins and Their Allergenic Properties. Master's thesis *Alabama A & M University.*

Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D. (2000) Lipid transfer protein: a pan-allergen in plantderived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *International archives of allergy and immunology* **122**, 20–32.

Astwood, J.D., Leach, J.N., Fuchs, R.L. (1996) Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnology* **14**, 1269–1273.

Babu, B.N.H., Venkatesh,Y.P. (2009) Clinico-Immunological Analysis of Eggplant (Solanum melongena) Allergy Indicates Preponderance of Allergens in the Peel, *World Allergy Organization Journal* **2** , 192–200 .

Balatsouras, D.G., Koukoutsis, G., Ganelis, P., Fassolis ,A., Korres, G.S. Kaberos, A. (2011) Study of Allergic Rhinitis in Childhood. *International Journal of Otolaryngology 2011*.

Bashir, M.E., Hubatsch, I., Leinenbach, H.P., Zeppezauer, M., Panzani, R.C. & Hussein, I.H. (1998) Ric c 1 and Ric c 3, the allergenic 2S albumin storage proteins of *Ricinus communis*: complete primary structures and phylogenetic relationships. *International Archhives of Allergy and Immunolgy* **115**, 73–82.

Ben-Shoshan, M., Turnbull, E., Clarke, A. (2012) Food allergy: temporal trends and determinants. *Current Allergy and Asthma Reports* **12**, 346-372.

Besler, M., Steinhart,H., Paschke, A. (2001) Stability of food allergens and allergenicity of processed food. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications* **756** *(1-2):207-28.*

Beyer, K., Morrow, E., Li, X., Bardina, L., Bannon, G.A.,Burks, A.W., Sampson, H.A. (2001) Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *Food and drug reactions and anaphylaxis*.

Bheemanapalli, N., Babu, H., Venkatesh, P., Y., (2009) Clinico – Immunological Analysis of Eggplant (Solanum melongena) Allergy Indicates Preponderance of Allergens in the Peel . *World Allergy Organization* **2**, 192-200.

Brenna, O.V., Pomei, C., Pravettoni, V., Farioli, L., Pastorello, E.A. (2005) Production of hypoallergenic foods from apricots. *Journal of Food Science and Tecnology* **70** (1), S38–S41.

Breiteneder, H., Radauer, C. (2004) A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**(5), 821-830.

Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A. (2012) Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition* **51**(6), 637–663.

Bohle, B., Radakovics, A., Jahn-Schmid, B., Hoffmann-Sommergruber, K., Fischer, G.F., Ebner, C. (2003) Bet v 1, the major birch pollen allergen, initiates sensitization to Api g 1, the major allergen in celery: evidence at the T cell level. *European Journal of Immunology* **33**, 3303-3310.

Bonds, R.S., Midoro-Horiuti, T., Goldblum, R. (2008) A structural basis for food allergy: the role of cross-reactivity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **8**, 82-86.

Boyce, J.A., Assa'a ,A., Burks ,A.W., Jones, S.M., Sampson, H.A., Wood, R.A., Plaut, M., Cooper, S.F., Fenton, M.J., Arshad, S.H., Bahna, S.L., Beck, L.A., Byrd-Bredbenner, C., Camargo, C.A., Jr., Eichenfield, L., Furuta, G.T., Hanifin, J.M., Jones, C., Kraft, M., Levy, B.D., Lieberman ,P., Luccioli, S., McCall, K.M., Schneider, L.C., Simon, R.A., Simons, F.E., Teach, S.J., Yawn, B.P., Schwaninger, J.M. and Panel, N.I-sE. (2011) Guidelines for the

diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID Sponsored Expert Panel Report. *Nutrition* **27**, 253-267.

Brenna, O., Pompei, C., Ortolani, C., Pravettoni, V., Pastorello, E.A., Farioli, L. (2000) Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(2), 493–497.

Bu, G., Luo, Y., Zhang, Y. and Chen, F. (2010) Effects of fermentation by lactic acid bacteria on the antigenicity of bovine whey proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 2015-2020.

Bublin, M., Radauer, C., Knulst., A., Wagner, S., Scheiner, O.Mackie, A.R., Mills, E.N.C., Breitener, H. (2008) Effects of gastrointestinal digestion and heating on the allergenicity of the kiwi allergens Act d 1, actinidin , and Act d 2, a thaumatin- like protein. *Molecular Nutrition and Food Research* **52**(10), 1130- 1139.

Burks, A.W., Jones, S.M., Boyce, J.A., Sicherer, S.H., Wood, R.A., Assa'ad, A. and Sampson, H.A. (2011) NIAID sponsored 2010 guidelines for managing food allergy: applications in the pediatric population. *Pediatrics* **128**, 955-965.

Byun, M.W., Kim, J.H., Lee, J.W., Park, J.W., Hong ,C.S., Kang, I.J. (2000) Effects of gamma radiation on the conformational and antigenic properties of a heat-stable major allergen in brown shrimp. *Journal of Food Protection* **63**(7), 940-944.

Caballero T., Martin-Esteban, M., Garcia-Ara, C., Pascual, C., Ojeda, A. (1994) Relationship between pollinosis and fruit or vegetable sensitization. *Pediatric Allergy, Immunology and Pulmonology* **5**(4), 218–222.

Chizoba Ekezie, F.G., Cheng, J-H., Sun, D-W. (2018) Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens: A review of recent research advances. *Trends in Food Science & Technology* **74**, 12-25.

Chung, S.Y., Maleki, S.J., Champagne, E.T. (2004) Allergenic properties of roasted peanut allergens may be reduced by peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chem*istry **52**(14), 4541-4545.

Chung , S.Y., Yang, W., Krishnamurthy, K. (2008) Effects of pulsed UV-light on peanut allergens in extracts and liquid peanut butter. *Journal of Food Science* **73**, C400-404.

Codina ,R., Ardusso, L., Lockey, R.F., Crisci, C. and Medina, I. (2003) Allergenicity of varieties of soybean. *Allergy* **58**, 1293-1298.

D'Amato G., Cecchi L., Bonini S., Nunes C., Annesi‐Maesano I., Behrendt H., Liccardi G., Popov T., Van Cauwenberge P. (2007) Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy* **62**, 976-990.

Désormeaux, A., Blochet, J.E., Pézolet, M., Marion, D. (1992) Amino acid sequence of a nonspecific wheat phospholipid binding protein and its conformation revealed by infrared and Raman spectroscopy, Role of disulphide bridges and phospholipids in stabilizing the α-helix. *Biochimica Biophysica Acta* **1121**, 137–152.

Državni zavod za statistiku (DZS) 2018. Statistički ljetopis Republike Hrvatske. Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske, Zagreb.

Dube, M., Zunker, K., Neidhart, S., Carle, R., Steinhart, H., Paschke, A. (2004) Effect of technological processing on the allergenicity of mangoes (Mangifera indica L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(12), 3938–3945.

Dupont, C., Kalach, N., Soulaines, P., Legoue-Morillon ,S., Piloquet, H., Benhamou, P.H. (2010) Cow's milk epicutaneous immunotherapy in children: a pilot trial of safety, acceptability, and impact on allergic reactivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, 1165-1167.

Dupont, C. (2011) Food allergy: recent advances in pathophysiology and diagnosis. *Annals of Nutrition and Metabolism* **59**, Suppl 1, 8-18.

EFSA (European Food Safety Authority) Journal (2014) **12**(11): 3894.

Ehn, B.M., Ekstrand,B., Bengtsson, U., Ahlstedt, S. (2004) Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen beta-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 1398-1403.

Eigenmann, P.A., Beyer, K., Wesley Burks, A., Lack, G., Liacouras, C.A., Hourihane, J.O., Sampson, H.A., Sodergren, E. (2008) New visions for food allergy: an iPAC summary and future trends. *Pediatric Allergy and Immunology* **19**, Suppl 19, 26-39.

El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S.R., Luciani, A., Potter, S.C., Qureshi, M., Richardson, L.J., Salazar, G.A., Smart, A., Sonnhammer, E.L.L., Hirsh, L., Paladin, L.,

Piovesan, D.,Tosatto, S.C.E.,Finn, R.D. (2019) The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research,* **47,** *D1, doi: 10.1093/nar/gky995*

Eriksson, N.E., Formgren, H., Svenonius, E. (1982) Food hypersensitivity in patients with pollen allergy. Allergy: *European Journal of Allergy and Clinical Immunology* **37**(6), 437–443.

Esclapez, M.D., García-Pérez, J.V., Mulet, A., Cárcel, J.A. (2011) Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews.* **3**(2):108–120.

Farkas, J. (1998) Irradiation as a method for decontaminating food. *International Journal of Food Microbiology.* **44**(3), 189-204.

Fiocchi, A., Bouygue, G.R.,Sarratud, T.,Terracciano, L., Martelli, A., Restani, P. (2004) Clinical tolerance of processed foods. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* **93**(5) : S38–S46.

Gadermaier, G., Egger, M., Girbl, T., Erler, A., Harrer, A., Vejvar, E. (2011) Molecular characterization of Api g 2, a novel allergenic member of the lipid-transfer protein 1 family from celery stalks. *Molecular Nutrition and Food Research* **55**(4), 568–577.

Gaier, S., Marsh, J., Oberhuber, C., Rigby, N.M., Lovegrove, A., Alessandri, S. (2008) Purification and structural stability of the peach allergens Pru p 1 and Pru p 3. *Molecular Nutrition and Food Research* **52**(S2), 220–229.

Gajdoš Kljusurić, J. (2009) Modeliranje i optimiranje u nutricionizmu. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.

Ganglberger, E., Radauer, C., Grimm, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Breiteneder, H., Scheiner, O. (2000) N-terminal sequences of high molecular weight allergens from celery tuber. *Clinical and Experimental Allergy* **30**(4), 566–570.

Gincel, E., Simorre, J. P., Caille, A., Marion, D., Ptak, M., Vovelle, *F. (1994),* Threedimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional 1H-NMR data. A new folding for lipid carriers. *European Journal of Biochemistry **226**: 413–22.*

Gonzalez-Perez, A., Aponte, Z., Vidaurre, C.F., Rodriguez, L.A. (2010) Anaphylaxis epidemiology in patients with and patients without asthma: a United Kingdom database review. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, 1098-1104.

Guandalini, S., Newland, C. (2011) Differentiating food allergies from food intolerances. *Current Gastroenterology Reports* **13**, 426-434.

Guex, N. & Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714–2723.

Gupta, R.S., Springston, E.E., Warrier, M.R., Smith ,B., Kumar ,R., Pongracic, J., Holl, J.L. (2011) The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics* **128**(1), 9-17.

Halmepuro, L., Vuontela, K., Kalimo, K. & Bjorksten, F. (1984) Cross-reactivity of IgE antibodies with allergens in birch pollen, fruits and vegetables. *International Archives of Allergy and Immunology* **74**, 235–240.

Harish Babu B.N., Wilfred A., Venkatesh Y.P. (2016) Emerging food allergens: Identification of polyphenol oxidase as animportant allergen in eggplant (*Solanum melongena* L.), *Immunobiology* **222**(2), 155-163.

Harish Babu B. N., Maheshw P. A., Venkatesh Y. P. (2008) A cross-sectional study on the prevalence of food allergy to eggplant (Solanum melongena L.) reveals female predominance. *Clinical and Experimental Allergy* **38**, 1795–1802.

Harrer A, Egger M, Gadermaier G, Erler A, Hauser M, Ferreira F and Himly M, 2010. Characterization of plant food allergens: an overview on physicochemical and immunological techniques. *Molecular Nutrition and Food Research* **54**, 93-112.

Hauser, M., Roulias, A., Ferreira, F., Egger, M. (2010) Panallergens and their impact on the allergic patient. Allergy, *Asthma and Clinical Immunology* **6**, 1.

Hawrylowicz, C.M., O'Garra , A. (2005) Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology* **5,** 271–283.

Hildebrandt, S., Kratzin, H.D., Schaller, R., Fritsche, R., Steinhart, H., Paschke, A. (2008) In vitro determination of the allergenic potential of technologically altered hen's egg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 1727-1733.

Hill, D.J., Ford, R.P.K., Shelton, M.J., Hosking, C.S. (1984) A study of 100 infants and young children with cow's milk allergy. *Clinical eviews in Allergy* **2**, 125-142.

Hoseini-Alfatemia S.M., Bayryb J.,Sharifi-Rade J. (2015) IgE response to two new allergen proteins of Solanum melongena L.(eggplant), *Immunol Lett.* **168**(2), 268-270.

Hourihane, J.O., Dean, T.P., Warner, J.O. (1996) Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* **313**, 518-521.

Houska, M., Heroldova, M., Vavrova, H., Kucera, P., Setinova, I., Havranova, M., Honzova,S., Strohalm, J., Kminkova, M.,Proskova,A., Novotna,P. (2009) Is high-pressure treatment able to modify the allergenicity of the main apple juice allergen, Mal d1 *High Pressure Research* **29**(1):14–22.

Husband, F. A., Aldick, T., Van der Plancken, I., Grauwet , T., Hendrickx, M., Skypala, I.,Mackie, A. R. (2011) High – pressure treatment reduces the immunoreactivity of the major allergens in apple and celeriac. *Molecular Nutrition and Food Research* **55**, 1087 – 1095.

Jankiewicz, A., Baltes, W., Bögl, K.W., Dehne, L.I., Jamin, A., Hoffmann, A., Haustein, D., Vieths, S. (1997) Influence of food processing on the immunochemical stability of celery allergens. *Journal of the Science of Food Agriculture* **75**(3), 359–370.

Johnson, P.E., Van der Plancken, I., Balasa, A., Husband, F.A. , Grauwet, T., Hendrickx, M., Knorr, D.K., Mills, E.N.C., Mackie, A.R. (2010) High pressure, thermal and pulsed electric-field-induced structural changes in selected food allergens *Molecular Nutrition & Food Research* **54**, 1701–1710 .

Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.A., Flabbee, J.,Beaudouin, E., Morisset, M., Thevenin, F. (2001) Population study of food allergy in France. *Journal of Allergy and Clinical Immunol*ogy **108**(1), 133–140.

Kasera, R., Singh, A.B., Kumar, R., Lavasa, S., Prasad, K.N. and Arora, N. (2012) Effect of thermal processing and gamma-irradiation on allergenicity of legume proteins. *Food and Chemical Toxicology* **50**, 3456-3461.

Kato, T., Katayama, E., Matsubara, S., Omi, Y., Matsuda, T. (2000) Release of allergenic proteins from rice grains induced by high hydrostatic pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(8), 3124-3129.

Kelly, J.D. & Hefle, S.L. (2000) 2S methionine-rich protein (SSA) from sunflower seed is an IgE binding protein. *Allergy* **55**, 556–559.

Kiefte-de Jong, J.,C, Escher, J.C., Arends, L.R., Jaddoe, V.W., Hofman, A., Raat, H., Moll, H.A. (2010) Infant nutritional factors and functional constipation in childhood: the Generation R study. *American Journal of Gastroenterology* **105**, 940-945.

Koletzko, S., Niggemann, B., Arato, A., Dias, J.A., Heuschkel, R., Husby, S., Mearin, M.L., Papadopoulou, A., Ruemmele, F.M., Staiano, A., Schappi, M.G., Vandenplas ,Y., European Society of Pediatric Gastroenterology H, and Nutrition. (2012) Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: ESPGHAN GI Committee practical guidelines. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **55**, 221-229.

Kurosaka, F., Terada, T., Tanaka, A., Nakatani, Y., Yamada, K., Nishikawa, J., Oka, K., Takahashi, H., Mogami ,A., Yamada, T., Nakano, T., Shima, M., Nishio, H. (2011) Risk factors for wheezing, eczema and rhinoconjunctivitis in the previous 12 months among six-year-old children in Himeji City, Japan: food allergy, older siblings, day-care attendance and parental allergy history. *Allergology International* **60**, 317-330.

Kurtanjek, Ž., Gajdoš Kljusurić, J. (2014) Statistical modelling of anthropometric characteristics evaluated on nutritional status. *Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology (ur. Granato, D. i Ares, G.) John Wiley and Sons, Oxford, UK.* str. 285 – 302.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.

Larenas-Linnemann, D. (2009) Sublingual immunotherapy in children: complete and updated review supporting evidence of effect. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **9**, 168-176.

Li, H., Zhu, K. , Zhou, H. and Peng, W. (2012) Effects of high hydrostatic pressure treatment on allergenicity and structural properties of soybean protein isolate for infant formula. *Food Chemistry* **132**, 808-814.

Li, H., Yu, J., Ahmedna, M. and Goktepe, I. (2013) Reduction of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2, in roasted peanuts by ultrasound assisted enzymatic treatment. *Food Chemistry* **141**, 762-768.

Li, Z.X., Lin, H., Cao, L., Jamil, K. (2007) Impact of irradiation and thermal processing on the immunoreactivity of shrimp (Penaeus vannamei) proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**(6), 951-956

Luo, C., Hu, C., Gao, J., Li, X,, Wu, Z., Yang,. A and Chen, H. (2013) A potential practical approach to reduce Ara h 6 allergenicity by gamma irradiation. *Food Chemistry* **136**, 1141-1147.

Malley, A., Baecher, L., Mackler, B. & Perlman, F. (1975) The isolation of allergens from the green pea. *Journal of Allergy Clinical Immunology* **56**, 282–290.

Manzocco, L., Nicoli, M.C. (2012) Macromolecular crowding affects protein photosensitivity: The case of egg white immunoreactivity. *Food Chemistry* **132**, 982-988.

Marić, M., Ninčević Grassino, A., Zhu, Z., Barba, F.J., Brnčić, M., Rimac Brnčić, S. (2018)An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science and Technology*,**76**, 28-37.

Marion, D., Douliez, J.P., Gautier, M.F., Elmorjani, K. (2004) U: Plant Food Allergens, Ur: Mills, E.N. C., Shewry, P. R., *Blackwell Science*, Oxford, Velika Britanija.

Maruyama, N, Adachi, M, Takahashi, K. (2001) Crystal structures of recombinant and native soybean beta-conglycinin beta homotrimers. *European Journal of Biochemistry* **268**: 3595–604.

Marzban, G., Herndl, A., Pietrozotto, S., Banerjee, S., Obinger, C., Maghuly, F., Hahn, R., Boscia, D., Katinger, H., Laimer, M. (2009) Conformational changes of Mal d 2, a thaumatin-like apple allergen, induced by food processing. *Food Chemistry* **112**(4), 803–811.

McFeeters, R.F. (1988) Effects of Fermentation on the Nutritional Properties of Food. *Nutritional Evaluation of Food Processing*, 423-446.

Menéndez-Arias, L., Moneo, I., Domínguez, J. & Rodríguez, R. (1988) Primary structure of the major allergen of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) seed, Sin a I. *European Journal of Biochemistry* **177**, 159-166.

Meyer-Pittroff, R., Behrendt, H., Ring, J. (2007) Specific immuno-modulation and therapy by means of high pressure treated allergens. *High Pressure Research* **27**(1), 63–67.

Mills, E.N.C., Sancho, A.I.,Rigby, N.M., Jenkis, J.A., Mackie, A.R. (2009) Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Molecular Nutrition and Food Research* **53**, 963 – 969.

Monaci L., Visconti A. (2009) Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *Trends in Analytical Chemistry* **28**(5).

Mondoulet , L., Paty, E, Drumare ,M.F., Ah-Leung, S, Scheinmann, P., Willemot ,R.M. , Wal, J.M. and Bernard, H. (2005) Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 4547-4553.

Monsalve, R.I., Villalba, M. & Rodríguez, R. (2001) Allergy to mustard seeds: the importance of 2S albumins as food allergens. *Internet Symposium Food Allergens* **3**, 57–69.

Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A., Menéndez-Arias, L., López-Otín, C., Villalba, M. & Rodríguez, R. (1993) Characterization of a new oriental-mustard (*Brassica juncea*) allergen, Bra j IE: detection of an allergenic epitope. *Biochemical Journal* **293**, 625–632.

Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A., López-Otín, C. (1997) Detection, isolation and complete amino acid sequence of an aeroallergenic protein from rapeseed flour. *Clinical and Experimental Allergy* **27**, 833–841.

Muraro, A., Werfel, T., Hoffmann-Sommergruber, K., Roberts, G., Beyer, K., Bindslev-Jensen, C., Cardona, V., Dubois, A., duToit, G., Eigenmann, P., Fernandez Rivas, M., Halken, S., Hickstein, L., Host, A., Knol, E., Lack, G., Marchisotto, M.J., Niggemann, B., Nwaru, B.I., Papadopoulos, N.G., Poulsen, L.K., Santos, A.F., Skypala, I., Schoepfer, A., Van Ree, R., Venter, C., Worm, M., Vlieg-Boerstra, B., Panesar, S., de Silva, D., Soares-Weiser, K., Sheikh, A., Ballmer-Weber, B.K., Nilsson, C., de Jong, N.W., Akdis, C.A. and the EAACI Food Allergy Anaphylaxis Guidelines Group, (2014) EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy* **69**, 1008-1025.

Nordlee, J.A., Taylor, S.L., Jones, R.T., Yunginger, JW. (1981) Allergenicity of various peanut products as determined by RAST inhibition. *Journal Allergy and Clinical Immunology* **68**(5), 376-382.

Nordlee, J.A., Taylor, S.L., Townsend, J.A., Thomas, L.A. & Bush, R.K. (1996) Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *The New England Journal of Medicine* **334**, 688–692.

Nowak-Wegrzyn, A., Muraro, A. (2009) Food protein-induced enterocolitis syndrome. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **9**, 371-377.

Nowak-Wegrzyn, A., Sampson, H.A. (2011) Future therapies for food allergies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **127**, 558-573; 574-555.

Nwaru, B.I., Hickstein, L., Panesar, S.S., Muraro, A., Werfel, T., Cardona, V., Dubois, A.E., Halken, S., Hoffmann-Sommergruber, K., Poulsen, L.K., Roberts, G., Van Ree, R., Vlieg-Boerstra, B.J., Sheikh, A. ,EAACI Food Allergy Anaphylaxis Guidelines Group (2014) The epidemiology of food allergy in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* **69**, 62-75.

Oehling, A., Garcia, B., Santos, F., Cordoba, H., Dieguez, I., Fernandez, M., Sanz, M.L. (1992) Food allergy as a cause of rhinitis and/or asthma. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* **2**, 78-83.

Ortolani,C., Ispano, M., Pastorello, E., Bigi, A., Ansaloni, R. (1988) The oral allergy syndrome. *Annals of Allergy* **61**, 47-52.

Osterballe, M., Hansen, T., Mortz, C., Høst, A., Bindslev-Jensen, C. (2005) The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults. *Pediatric Allergy and Immunology* **16**(7), 567–573.

Oyebode, O., Gordon-Dseagu, V., Walker, A., Mindell, J.S. (2014) Fruit and vegetable consumption and all-cause, cancer and CVD mortality: analysis of Health Survey for England data. *Journal of Epidemiology and Community Health.*

Paschke, A. (2009) Aspects of food processing and its effect on allergen structure. *Molecular Nutrition & Food Research* **53**, 959 – 962.

Pastorello, E.A., Pravettoni ,V., Calamari, A.M., Banfi, E. and Robino, A.M. (2002) New plant-origin food allergens. *Allergy* **57**, 106-110.

Pastorello E.A., Farioli L., Stafylaraki C., Scibilia J., Giuffrida M.G., Mascheri A., Piantanida M., Baro C., Primavesi L., Nichelatti M., Schroeder J.W., Pravettoni V. (2013) Fennel Allergy is an LTP (Lipid Tranfer Protein) Related Food Hypersensitivity Associated to Peach Allergy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**(3), 740-6.

Pastorello,E.A., Farioli,L., Stafylaraki, C., Scibilia, J., Giuffrida,M.G., Mascheri, A., Piantanida, M., Baro,C., Primavesi,L., Nichelatti, M., Schroeder, J.W., Pravettoni, V., (2012) . Fennel Allergy is an LTP (Lipid Tranfer Protein) Related Food Hypersensitivity Associated to Peach Allergy . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .

Peñas, E., Gomez, R., Frias, J., Baeza, M.L. and Vidal-Valverde, C. (2011) High hydrostatic pressure effects on immunoreactivity and nutritional quality of soybean products. *Food Chemistry* **125**, 423-429.

Pereira, B., Venter, C., Grundy, J., Clayton, C.B., Arshad, S.H. and Dean, T. (2005) Prevalence of sensitization to food allergens, reported adverse reaction to foods, food avoidance, and food hypersensitivity among teenagers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **116**, 884-892.

Petz. B (2007) Osnovne statističke metode za nematematičare. Naklada Slap, Zagreb.

Pumphrey, R.S.H., Gowland, M.H. (2007) Further fatal allergic reactions to food in the United Kingdom, 1999-2006. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **119**, 1018-1019.

Quirce, S., Bombin, C., Aleman, A. & Sastre, J. (2000) Allergy to latex, fruit, and pollen. *Allergy* **55**, 896–898.

Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A., Breiteneder, H. (2008) Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *Journal of Allergy Clinical Immunology* **121**, 847-52.

Rancé, F., Grandmottet, X., Grandjean, H. (2005) Prevalence and main characteristics of schoolchildren diagnosed withfood allergies in France. *Clinical and Experimental Allergy* **35**(2), 167–172.

Reindl, J., Rihs, H.P., Scheurer, S., Wangorsch, A., Haustein, D., Vieths, S. (2002) IgE reactivity to profilin in pollen-sensitized subjects with adverse reactions to banana and pineapple. *International Archives of Allergy and Immunology* **128**, 105–114.

Roehr, C., Edenharter, G., Reimann, S., Ehlers, I., Worm, M., Zuberbier, T., Niggemann, B. (2004) Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents. *Clinical and Experimental Allergy* **34**(10), 1534–1541.

Rona, R.J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E, Sigurdardottir ,S.T., Lindner ,T., Goldhahn,. K, Dahlstrom, J., McBride, D., Madsen, C. (2007) The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **120**, 638-646.

Sampson HA. (2006) Anaphylaxis: persistent enigma. *Emergency Medicine Australasia* **18**, 101-102.

Sancho, A.I., Rigby, N.M., Zuidmeer, L., Asero, R., Mistrello, G., Amato, S. (2005) The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, Mal d 3. *Allergy* **60**(10), 1262–1268.

Sastre, J. (2010) Molecular diagnosis in allergy. *Clinical and Experimental Allergy* **40**,1442-1460.

Sathe, S.K., Teuber, S.S., Roux, K.H. (2005) Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnology Advances* **23**(6), 423-429.

Sathe S.K., Sharma G.M. (2009) Effects of food processing on food allergens. *Molecular Nutrition and Food Research* **53**, 970-978.

Schäfer, T., Böhler, E., Ruhdorfer, S., Weigl, L., Wessner, D., Heinrich, J. (2001) Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy. *Allergy* **56**(12), 1172–1179.

Scheurer, S., Lauer, I., Foetisch, K., Moncin, M.S.M., Retzek, M., Hartz, C. (2004) Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *Journal of Allergy and Clinical Immunolology* **114**(4), 900–907.

Scheurer, S., Wangorsch, A., Haustein, D. & Vieths, S. (2000) Cloning of the minor allergen Api g 4 profilin from celery (Apium graveolens) and its cross-reactivity with birch pollen profilin Bet v 2. *Clinical and Experimental Allergy* **30**, 962–971.

Scheurer, S., Wangorsch, A., Nerkamp, J. (2001)Cross-reactivity within the profilin panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins from pear (Pyr c 4), cherry (Pru av 4) and celery (Api g 4) with birch pollen profilin Bet v 2. *Journal of Chromatography B:Biomedical Sciences and Application* **756**, 315–325.

Schirmer, T., Hoffmann-Sommergruber, K., Susani, M., Breiteneder, H., Markovichousley, Z. (2005) Crystal structure of the major celery allergen Api g 1: molecular analysis of cross-reactivity. *Journal of Molecular Biology* **351**: 1101–9.

Schluter, K., Jockusch, B.M. & Rothkegel, M. (1997) Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochimica Biophysica Acta* **1359**, 97–109.

Sharief, F.S., Li, S.S. (1982) Amino acid sequence of small and large subunits of seed storage protein from Ricinus communis. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 14753–14759.

Shibasaki, M., Suzuki, S., Tajima, S., Nemoto, H., Kuroume, T. (1980) Allergenicity of major component proteins of soybean. *International Archives of Allergy and Immunology* **61**, 441–448.

Shriver, S.K.,Yang, W.W.(2011) Thermal and Nonthermal Methods for Food Allergen Control. *Food Engineering Reviews* **3**(1) , 26-43.

Sicherer, S.H. (2001) Clinical implications of cross-reactive food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunolology* **108**(6), 881–890.

Sicherer, S.H., Sampson, H.A. (2010) Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunolology* **125(**2), S116– S125.

Sicherer, S.H., Sampson, H.A. (2013) Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **133(**2), 291-307.

Smole, U., Bublin, M., Radauer, C., Ebner, C., Breiteneder, H. (2008) Mal d 2, the Thaumatin-Like allergen from apple, is highly resistant to gastrointestinal digestion and thermal processing. *International Archives of Allergy and Immunology* **147**(4), 289–298.

Soares-Weiser, K., Takwoingi, Y., Panesar, S.S., Muraro, A., Werfel, T., Hoffmann-Sommergruber, K., Roberts, G., Halken, S., Poulsen, L., van Ree, R., Vlieg-Boerstra, B.J., Sheikh, A. EAACI Food Allergy Anaphylaxis Guidelines Group (2014) The diagnosis of food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* **69**, 76-86.

Soller, L., Ben-Shoshan, M., Harrington, D.W., Fragapane, J., Joseph, L., St Pierre, Y., Godefroy, S.B., La Vieille, S., Elliott, S.J., Clarke, A.E. (2012) Overall prevalence of self-reported food allergy in Canada. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **130**, 986-988.

Soria, A.C., Villamiel, M. (2010) Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science and Technology* **21**(7), 323-331.

Spies, J. R. (1974) Allergens. *Journal of agricultural and food chemistry* **22**(1), 30-36.

Srivastava, K.D., Qu, C., Zhang, T., Goldfarb, J., Sampson, H.A, and Li, X-M. (2009) Food Allergy Herbal Formula-2 silences peanut-induced anaphylaxis for a prolonged posttreatment

period via IFN-γ– producing CD8+ T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **123**, 443-451.

Stanić-Vučinić, D., Prodić, I., Apostolović, D., Nikolić, M., Velicković, T.Ć. (2012) Structure and antioxidant activity of β-lactoglobulin-glycoconjugates obtained by high-intensity-ultrasound-induced Maillard reaction in aqueous model systems under neutral conditions. *Food Chemistry* **138**(1), 590-599.

Stanley, J.S., King, N., Burks, A.W. (1997) Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h 2. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **342,** 244–253.

Strannegard, O., Strannegard, I.L. (2001) The causes of the increasing prevalence of allergy: is atopy a microbial deprivation disorder? *Allergy* **56**, 91-102.

Straumann, A., Conus, S., Grzonka, P., Kita, H., Kephart, G., Bussmann, C., Beglinger, C., Smith, D.A., Patel, J., Byrne, M., Simon, H.U. (2010) Anti-interleukin-5 antibody treatment (mepolizumab) in active eosinophilic oesophagitis: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Gut* **59**, 21-30.

Su, M., Venkatachalam, M., Teuber, S.S., Oux, K.H., Sathe, S.K. (2004) Impact of γ-irradiation and thermal processing on the antigenicity of almond, cashew nut and walnut proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **84**, 1119-1125.

Summers, C.W., Pumphrey, R.S., Woods, C.N., McDowell,. G, Pemberton, P.W., Arkwright, P.D. (2008) Factors predicting anaphylaxis to peanuts and tree nuts in patients referred to a specialist center. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121**, 632-638.

Tammineedi,C.V.R.K., Choudhary, R., Perez-Alvarado, G.C., Watson, D. (2013) Determining the effect of UV-C, high intensity ultrasound and nonthermal atmospheric plasma treatments on reducing the allergenicity of α-casein and whey proteins. *Food Science and Technology* **54**(1), 35-41.

Thomas, K.,Herouet-Guicheney C.,Ladics, G.,Bannon,G., Cockburn, A.,Crevel,R.,Fitzpatrick, J.,Mills,C.,Privalle,L., Vieths, S. (2007) Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: International workshop report. *Food and Chemical Toxicology* **45**, 1116-1122 .

Tsujimura, Y., Obata, K., Mukai, K., Shindou, H., Yoshida, M., Nishikado, H., Kawano, Y., Minegishi, Y., Shimizu, T., Karasuyama, H. (2008) Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity* **28**, 581-589.

Tuppo, L., Giangrieco, I., Alessandri C., Ricciardi, T., Rafaiani, C., Ciancamerla, M., Ferrara, R., Zennaro, D., Bernardi, M.L., Tamburrini, M., Mari, A., Ciardiello, M.A. (2018) Pomegranate chitinase III: Identification of a new allergen ananalysis of sensitization patterns to chitinases. *Molecular Immunology* **103**, 89-95.

Uberti, F., Peñas, E., Manzoni, Y., Lorenzo, C., Ballabio, C., Fiocchi, A. (2015) Molecular characterization of allergens in raw and processed kiwifruit. *Pediatr Allergy Immunology* **26**(2), 139–144.

Uredba (EU) br. 1169/2011 Europskog parlamenta i Vijeća od 25. listopada 2011. o informiranju potrošača o hrani.

Vanga, S.K., Singh, A., Raghaven, V. (2017) Review of conventional and novel food processing methods on food allergens, *Critical reviews in food science and nutrition* **57(10**), 2077-2094.

Venkatachalam, M., Teuber, S.S., Roux, K.H., Sathe, S.K. (2002) Effects of roasting, blanching, autoclaving, and microwave heating on antigenicity of almond (Prunus dulcis L.) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(12), 3544-3548.

Venter,C., Pereira, B., Voigt, K., Grundy ,J., Clayton, C.B., Higgins, B., Arshad, S.H., Dean, T. (2008) Prevalence and cumulative incidence of food hypersensitivity in the first 3 years of life. *Allergy* **63**, 354-359.

Verhoeckx, K.C.M., Vissers Y.M., Baumert , J.L., Faludi, R., Fey, R., Flanagan, S., Herouet – Guicheney, C., Holzhauser, T., Shimojo, R., Van der Bolt, Nieke.,Wichers, H., Kimber, I. (2015) Food processing and allergenicity. *Food and Chemical Toxicology* **80**, 223-240.

Victorino, C.C. and Gauthier, A.H. (2009) The social determinants of child health: variations across health outcomes - a population-based cross-sectional analysis. *BMC Pediatrics* **9**, 53.

Vighi, G., Marcucci, F., Sensi ,L., Di Cara, G., Frati, F. (2008) Allergy and the gastrointestinal system. *Clinical and Experimental Immunology* **153**, Suppl 1, 3-6.

Villalba, M., Monsalve, R.I., Batanero, E. & Ledesma, A. (2000) Cloning and expression of BnI, a 2S albumin from *Brassica napus* seeds with allergenic properties. *Allergy* **55**, 128.

Vranić, V. (1958) Vjerojatnos i statistika. Tehnička knjiga, Zagreb.

Wang, J., Lin, J., Bardina, L., Goldis, M., Nowak-Wegrzyn ,A., Shreffler ,W.G., Sampson, H.A. (2010) Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, 695-702.

Waserman, S., Watson, W. (2011) Food allergy. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology* **7,** Suppl 1, S7.

Webber, C.M., England, R.W. (2010) Oral allergy syndrome: a clinical, diagnostic, and therapeutic challenge. Annals of Allergy, *Asthma, and Immunology* **104**, 101-110, 117.

White, J.F., Bernstein, D.I. (2003) Key pollen allergens in North America. Ann. *Allergy, Asthma and Immunol*ogy **91**(5), 425–435.

Wigotzki, M., Schubert, S., Steinhart, H. and Paschke, A. (2000) Effects of in vitro digestion on the IgE binding activity of proteins from hazelnus (Corylus avellana). *Internet Symposium on Food Allergens* **2**, 1-8.

Yang, W., Shriver ,S. , Chung, S-y., Percival, S., Correll, M. and Rababah, T. (2012) In vitro gastric and intestinal digestions of pulsed light-treated shrimp extracts. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **166**, 1409-1422.

Yang, W.W., Chung, S-Y., Ajayi ,O., Krishnamurthy, K., Konan, K., Goodrich-Schneider R. (2010) Use of Pulsed Ultraviolet Light to Reduce the Allergenic Potency of Soybean Extracts. *International Journal of Food Engineering* **6**(3),1556-3758.1876.

Youle, R.J., Huang, A.H. (1979) Albumin storage protein and allergens in cottonseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **27**, 500–503.

Yu, H-L., Cao, M-J., Cai, Q-F., Weng, W-Y., Su, W-J. and Liu, G-M. (2011) Effects of different processing methods on digestibility of Scylla paramamosain allergen (tropomyosin). *Food and Chemical Toxicology* **49**, 791-798.

Zellal, D., Kaddouri H., Hadria B., Belarbi H., Kheroua O., Saidi D. (2011) Allergenic changes in β-lactoglobulin induced by microwave irradiation under different pH conditions. *Food and Agricultural Immunology* **22**(4), 355-363.

Zhang, T ; Shi, YF ; Zhao, YQ ; Wang, JY ; Wang, MJ ; Niu, B ; Chen, Q Chen, (2019) Different thermal processing effects on peanut allergenicity. *Journal of the science of food and agriculture* **99**(5), 2321-2328.

Zuidmeer, L., Goldhahn, K., Rona, R.J., Gislason, D., Madsen, C., Summers, C. (2008) The prevalence of plant food allergies: A systematic review. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121**(5), 1210–1218.