

**ALERGIJA NA HRANU BILJNOG PODRIJETLA:
JABUKA KAO MODEL**

*BRANKO PEVEC¹, MIRA RADULOVIĆ PEVEC¹, ASJA STIPIĆ MARKOVIĆ¹,
IRENA BATIŠTA²*

Ustanova

¹ Odjel za kliničku imunologiju, pulmologiju i reumatologiju

² Imunološki laboratorij

Opća bolnica "Sveti Duh"

Zagreb, Hrvatska

Adresa autora

Mr. sc. Branko Pevec, dr. med.

Odjel za kliničku imunologiju, pulmologiju i reumatologiju

Opća bolnica "Sveti Duh"

Sveti Duh 64

10000 Zagreb, Hrvatska

Tel: +3851 3712 230; faks: +3851 3712 207

E-mail: branko.pevec@zg.htnet.hr

Sažetak

Alergijske reakcije na biljne namirnice obuhvaćaju čitav spektar kliničkih manifestacija - od vrlo blagih, lokaliziranih na sluznicu usne šupljine, do onih najtežih, uključujući po život opasan anafilaktički šok. Razlog tome je prisutnost po nekoliko alergena, različitih strukturnih i funkcionalnih karakteristika, u svakoj namirnici. S druge strane, sličnost pojedinih alergena u različitim namirnicama, kao i prisutnost njihovih homologa u drugim izvorima (peludi, otrovi insekata) daju široke mogućnosti križnih reakcija pri alergijskoj senzibilizaciji.

Jabuka zauzima važno mjesto u ljudskoj prehrani. Međutim, ona je ujedno i voće koje najčešće izaziva alergijske reakcije. Alergeni jabuke dobro su upoznati i adekvatno karakterizirani, a njihovi se homolozi mogu naći i u drugim namirnicama. Stoga jabuka predstavlja dobar model preosjetljivosti na hranu biljnog podrijetla.

Cilj je ovog rada na modelu jabuke prikazati mehanizme alergijske senzibilizacije, oblike kliničke pojavnosti, utjecaj varijabilnosti alergenskog sastava te dijagnostičke i terapijske probleme vezane uz alergiju na biljne namirnice.

Ključne riječi

nutritivna alergija, jabuka, Mal d 1, Mal d 3, biljne namirnice, križna reaktivnost, profil senzibilizacije, pelud breze

NUTRITIVNE ALERGIJE

Tradicionalno se smatralo da nutritivne alergije izazivaju samo alergeni rezistentni na toplinu i probavne enzime, koji mogu nepromijenjeni ući u organizam preko probavnog sustava te tako dovesti do alergijske senzibilizacije. Simptome izaziva svaki slijedeći kontakt s istim alergenom. Ovakvi alergeni nazivaju se kompletnim nutritivnim alergenima, a nutritivna alergija kod koje isti alergen dovodi do senzibilizacije organizma i do pojave simptoma naziva se nutritivna alergija tipa I (1, 2, 3).

U novije vrijeme primijećeno je da nutritivne alergije mogu izazvati i termolabilni alergeni te alergeni osjetljivi na probavne enzime. Međutim, simptomi se mogu javiti samo ako ingestirana hrana nije prethodno termički obrađena, a ograničeni su uglavnom na sluznicu usne šupljine jer u kontaktu s probavnim enzimima gube svoju alergogenost. Ovi alergeni nemaju sposobnost senzibilizacije organizma već samo mogu izazvati simptome u prethodno senzibiliziranom organizmu. Zbog toga se nazivaju inkompletnim nutritivnim alergenima. Senzibilizacija nastaje na neki strukturno sličan, odnosno, križno reaktivan alergen inhalacijskim ili kontaktnim putem. Nutritivna alergija kod koje jedan alergen dovodi do senzibilizacije organizma a drugi do pojave simptoma, naziva se nutritivna alergija tipa II (1, 2, 3).

Patofiziološki mehanizam opisanog zbivanja čini križna reaktivnost IgE protutijela, odnosno mogućnost vezanja jednog protutijela s dva ili više alergena (4, 5). Sličnost trodimenzionalne strukture konformacijskih epitopa koje stvorena protutijela prepoznaju na alergenima (6), predstavlja molekularnu osnovu križne reaktivnosti. Upravo zbog strukturne sličnosti proteinskih molekula, velik broj

alergena koji postoji u prirodi može se svrstati u samo nekoliko skupina (7, 8), a među članovima svake skupine postoji mogućnost križne reaktivnosti.

ALERGIJA NA JABUKU KAO PROTOTIP NUTRITIVNE ALERGIJE

Jabuka (*Malus domestica*) spada među nekoliko najšire uzgajanih vrsta voća širom svijeta. Zbog jednostavnog skladištenja i transporta dostupna je u svako doba godine. Zbog široke primjene u sirovom te u različitim prerađenim oblicima, zauzima važno mjesto u ljudskoj prehrani. Nažalost, jabuka je ujedno i voće koje najčešće izaziva alergijske reakcije (9, 10, 11).

Taksonomski spada u porodicu Rosaceae. Ovu porodicu čine potporodica Pomoideae, u koju osim jabuke spada i kruška (*Pyrus communis*) te potporodica Prunoideae čiji su glavni predstavnici breskva (*Prunus persica*), marelica (*Prunus armeniaca*), šljiva (*Prunus domestica*) i trešnja (*Prunus avium*).

Alergijske reakcije na jabuku razlikuju se u različitim geografskim područjima. U sjevernoj i centralnoj Europi većinom su vezane uz preosjetljivost na pelud breze i posredovane su križnom reaktivnošću IgE protutjela čija je produkcija potaknuta ovom peludi. Klinički se manifestiraju uglavnom simptomima oralnog alergijskog sindroma (OAS) (12, 13).

U južnijim dijelovima Europe, odnosno u Mediteranskom području čija vegetacija oskudijeva brezama, alergija na jabuku može biti vezana uz preosjetljivost na pelud trava ali se može javljati i bez pridružene polinoze. U prvom slučaju, mehanizam nastanka i kliničke manifestacije slične su onima vezanim uz preosjetljivost na pelud breze. U slučaju alergije na jabuku bez pridružene polinoze, senzibilizacija nastaje oralnim putem nakon ingestije same

jabuke ili nekog drugog voća, najčešće breskve. Klinički se obično manifestira sistemskim reakcijama kao što su urtikarija, angioedem, simptomi probavnog sustava, bronhoopstrukcija, pa čak i anafilaktički šok (14).

Alergeni jabuke su Mal d 1 - glavni alergen, termolabilni protein (18 kDa); Mal d 2 - thaumatinu sličan protein (31 kDa); Mal d 3 - protein prenosilac lipida (9 kDa); Mal d 4 - profilin (14 kDa) te još nekoliko alergena čija klinička značajnost nije potvrđena.

Mal d 1 spada u skupinu 1 peludi stabala reda Fagales, čiji su homolozi prisutni u peludima stabala (breza – Bet v 1, ljeska – Cor a 1, joha – Ahn g 1, grab – Car b 1, bukva – Fag s 1 itd.), u voću i povrću (kruška – Pyr c 1, marelica – Pru ar 1, trešnja – Pru av 1, mrkva – Dau c 1, celer – Api g 1) te u mahunarkama, koštunjičavom voću i sjemenkama (lješnjak – Cor a 1.04, soja – Gly m 4) (7). Homologija s Bet v 1, glavnim alergenom peludi breze, odgovorna je za pojavu križne reaktivnosti i posljedično simptoma OAS-a u većine bolesnika sjeverne i centralne Europe (9, 15, 16, 10).

Mal d 2 spada u skupinu thaumatinu sličnih proteina (TLP - thaumatin-like protein) (17, 7), prisutnih u nekim vrstama voća i povrća (trešnja – Pru av 2, kivi – Act c 2), a među peludima, za sada su izolirani samo iz peludi planinskog cedra – Jun a 3 (7) te iz peludi čempresa – Cup a 3 (18). Sličnosti u slijedu aminokiselina između pojedinih proteina ove skupine ukazuju na potencijalnu križnu reaktivnost, koja za sada nije dokazana (7). Unatoč velikom broju senzibiliziranih bolesnika (19), klinička značajnost ovog alergena još uvijek nije potvrđena.

Mal d 3 spada u skupinu proteina prenosilaca lipida (LTP - lipid transfer protein), prisutnih prvenstveno u različitim vrstama voća i povrća (kruška – Pyr c 3, breskva – Pru p 3, marelica – Pru ar 3, šljiva – Pru d 3, trešnja – Pru av 3,

kukuruz – *Zea m 14* itd.), u mahunarkama, koštunjičavom voću i sjemenkama (lješnjak – *Cor a 8*, kesten – *Cas s 8*, orah – *Jug r 3*), ali i u peludima stabala (maslina – *Ole e 7*) i korova (pelin – *Art v 3*, parijetarija – *Par j 1*, *Par j 2*, *Par o 1*, ambrozija – *Amb a 6*) te u nekim drugim izvorima (lateks – *Hev b 12*) (7, 20). Homologija s LTP-ima drugih biljnih vrsta daje široke mogućnosti križne reaktivnosti (21, 22, 23, 24, 25). Odgovorna je za pojavu simptoma u bolesnika Mediteranskog područja, s alergijom na jabuku bez pridružene polinoze (26, 27).

Mal d 4 spada u skupinu profilina, ubikvitarnih proteina prisutnih u svim eukariotskim stanicama: u peludima stabala (breza – *Bet v 2*, ljeska – *Cor a 2*, maslina – *Ole e 2* itd.), trava (livadna mačica – *Phl p 12*, livadna vlasnjača – *Poa p 12* itd.) i korova (pelin – *Art v 4*, parijetarija – *Par j 3* itd.), u voću i povrću (kruška – *Pyr c 4*, breskva – *Pru p 4*, trešnja – *Pru av 4*, mrkva – *Dau c 4*, celer – *Api g 4* itd.), u mahunarkama, koštunjičavom voću i sjemenkama (lješnjak – *Cor a 2*, kikiriki – *Ara h 5*, soja – *Gly m 3*) te u drugim izvorima (lateks – *Hev b 8*, ljudske stanice – *Hom s ?*) (7). Križna reaktivnost IgE protutijela stvorenih na profiline iz različitih izvora sa strukturno sličnim **Mal d 4** je velika, iako u većini slučajeva klinički irelevantna (28).

Zbog široke upotrebe, visoke prevalencije alergijskih reakcija koje izaziva te dobro upoznatih i adekvatno karakteriziranih alergena čiji se homolozi mogu naći i u drugim namirnicama, jabuka predstavlja dobar model preosjetljivosti na hranu biljnog podrijetla (29, 11).

Homolozi glavnog alergena peludi breze (*Bet v 1*), odgovornog za senzibilizaciju bolesnika s nutritivnom alergijom tipa II, izolirani su iz različitih biljnih namirnica: jabuke (**Mal d 1**) (16), celera (**Api g 1**) (30), trešnje (*Pru av 1*, ranije nazvan *Pru a 1*) (31), mrkve (*Dau c 1*) (32), kruške (*Pyr c 1*) (33) itd. Različito visok stupanj homologije korelirao je s taksonomskom pripadnošću.

Npr. između *Daucylis* i *Apigium* (mrkva i celer pripadaju istoj porodici, *Apiaceae*) oko 80% slijeda aminokiselina bilo je identično, dok je između taksonomski udaljenijih *Daucylis* i *Malus* (jabuka pripada porodici *Rosaceae*), odnosno *Daucylis* i *Betula* (breza pripada porodici *Fagaceae*) stupanj identičnosti aminokiselinskog slijeda bio oko 40% (32).

Slično tome, homolozi LTP-a breskve (*Prunus* 3), koji najčešće dovodi do senzibilizacije bolesnika s nutritivnom alergijom tipa I, izolirani su iz voća porodice *Rosaceae*: jabuke (*Malus* 3) (21), breskve (*Prunus* 3) (34), marelice (*Prunus* 3) (35), šljive (*Prunus* 3) (36), trešnje (*Prunus* av 3) (37), ali i iz nesrodnih biljnih namirnica, npr. kukuruza (*Zea mays* 14) (38). Homologija je u prvom slučaju iznosila oko 90% identičnosti aminokiselinskog slijeda (27), a u drugom oko 60% (35).

O sličnosti mehanizama nastanka alergijskih reakcija na različito voće i povrće svjedoče i nazivi "sindroma" opisanih tijekom istraživanja križne reaktivnosti IgE protutijela između alergena prisutnih u pojedinim namirnicama i njihovih homologa u različitim vrstama peludi ili nekim drugim izvorima: "apple-birch syndrome"; "birch-plant food syndrome"; "celery-mugworth-spice syndrome"; "celery-carrot-mugworth-spice syndrome"; "birch-mugworth-celery syndrome"; "latex-fruit syndrome"; itd.) (39, 40, 3, 41, 42).

PROMJENE U ALERGENSKOM SASTAVU JABUKE

Količina pojedinih alergena u jabuci može znatno varirati ovisno o sorti, stupnju maturacije, uvjetima skladištenja, ali i o ciljanim promjenama njihove ekspresije.

Razlike između pojedinih sorti

Do danas je opisano više od 1000 različitih sorti jabuka, od čega se oko stotinjak koristi u ljudskoj prehrani.

Budući da je Mal d 1 alergen odgovoran za pojavu simptoma u većine bolesnika sjeverne i centralne Europe, određena je njegova količina u najčešće korištenim sortama. Ispitane sorte razvrstane su na one s visokim (Granny Smith, Golden Delicious, Jonagold, Braeburn, Prime Rouge, Cox Orange, Apollo), srednjim (Sternrenette, Alkmene), niskim (Boskoop) i vrlo niskim (Jamba, Macoun, Ellison's Orange, Gloster, Altländer, Hammerstein) relativnim udjelom Mal d 1. Sorte s većim relativnim udjelom Mal d 1 pokazale su i veću potentnost vezanja IgE protutijela u imunološkim *in vitro* testovima (43). Kvantitativna analiza pokazala je da razlika u količini Mal d 1 između pojedinih sorti može biti i više nego deseterostruka (44).

Obzirom na važnost Mal d 3 alergena u Mediteranskom području, grupa španjolskih autora (45) ispitala je njegovu ekspresiju u najčešće korištenim sortama jabuka tog područja. Među ispitanim sortama (Royal Gala, Pink Lady, Starking, Granny Smith, Verdedoncella, Fuji, Golden Delicious, Golden Perlim, Reineta, Reineta Parda), najveću količinu Mal d 3 sadržala je sorta Starking, a najmanju Granny Smith i Golden Delicious.

Utjecaj maturacije i skladištenja

Količina, odnosno alergogena potentnost Mal d 1, može varirati i unutar iste sorte. U studiji njemačkih autora (46), uspoređene su količine ovog alergena

u jabukama različitih stupnjeva maturacije (ubranim s istog stabla u različitim vremenskim točkama). Rezultati su pokazali da nezrele jabuke sadrže manju, a zrele veću količinu Mal d 1. Porast količine alergena tijekom maturacije bio je izraženiji kod sorte koja konstitutivno eksprimira veću količinu Mal d 1 (Golden Delicious), u odnosu na sortu s manjom ekspresijom (Boskoop). Konstitutivni porast ekspresije za vrijeme faze rasta primijećen je i kod Mal d 2 u jabuke Fuji (47).

Skladištene jabuke (kupljene u dućanu) sadrže veću količinu Mal d 1 i Mal d 2 u odnosu na svježe ubrane jabuke iste sorte, dok jabuke koje su bile kroz duže vrijeme čuvane na +4° C pokazuju progresivno povećanje ekspresije Mal d 1 (19). Porast količine ovih alergena za vrijeme skladištenja pripisuje se njihovoj fiziološkoj ulozi kao PR (pathogenesis-related) proteina (19, 16), odnosno proteina povezanih s obranom biljaka od različitih patogena i nepovolnih utjecaja okoliša. Njihovu sintezu mogu inducirati virusne, bakterijske ili gljivične infekcije te utjecaji okoliša kao što su propuh, potapanje, smrzavanje, ozon, UV-B svjetlost i mehanička oštećenja (48). Pojedini PR proteini mogu biti i konstitutivno ekspimirani u određenim biljnim organima ili određenim fazama razvoja, dok u stresnim uvjetima ili pri izlaganju patogenima dolazi do njihove pojačane sinteze (20). Tijekom skladištenja i transporta jabuka je izložena različitim stresogenim utjecajima okoliša kao i različitim patogenima. Upravo ovi čimbenici mogu inducirati povećanu ekspresiju Mal d 1 (49), a vjerojatno i Mal d 2, čime jabuka povećava svoju rezistenciju.

Budući da Mal d 3 također spada u skupinu PR proteina, mogle bi se očekivati promjene i u njegovoj količini za vrijeme maturacije i skladištenja (21).

Manipulacije s (aler)genima jabuke

Iz ekonomskih razloga često se nastoji povećati rezistencija biljnih namirnica prema patogenima i drugim utjecajima okoliša. Povećanje rezistencije postiže se insercijom gena koji kodiraju ili povećavaju ekspresiju PR proteina (20). Potencijalni kandidat u jabuci bio je Mal d 2, budući da su analogni proteini (TLP) ranije korišteni za povećanje rezistencije u drugim transgeničnim biljkama. Međutim, kako je TLP jabuke sada klasificiran kao alergen, potreban je izuzetan oprez pri korištenju ove skupine proteina u svrhu povećavanja rezistencije bilja (50).

Unutar Europske zajednice osnovan je multidisciplinarni konzorcij čiji je zadatak razraditi strategije za smanjivanje incidencije alergijskih reakcija na namirnice biljnog podrijetla (11). Jedan od zadataka njihovog istraživačkog projekta SAFE je evaluirati mogućnost razvoja hipoalergene jabuke. Za sada se uspješno metodom RNA-interferencije dobiti nekoliko mladih sadnica jabuke sa znatno reduciranom ekspresijom Mal d 1 u listovima (51). Učinak je potvrđen kožnim testovima i imunoblot metodom. Transformirane biljke nisu pokazale nikakvih fenotipskih abnormalnosti u odnosu na divlji tip pa su razmnožene i trenutno se čeka da narastu do faze u kojoj počinju davati plodove, kako bi se ispitao konačni učinak. Postavlja se, međutim, pitanje potrebnih uvjeta za daljnji uzgoj transformiranih biljaka budući da je smanjivanjem ekspresije Mal d 1 smanjena njihova rezistencija prema patogenima i drugim utjecajima okoliša. Ipak, autori metodu RNA-interferencije smatraju obećavajućom za buduću produkciju hipoalergenih sorti jabuka.

NAČINI SENZIBILIZACIJE I KLINIČKA EKSPRESIJA NUTRITIVNE ALERGIJE

Ekspozicija različitim alergenskim izvorima karakterističnim za pojedine geografske regije dovodi do stvaranja različitih profila senzibilizacije (29). To znači da će spektar stvorenih specifičnih IgE protutijela odražavati razlike u biljnom svijetu, klimatskim uvjetima i prehrambenim navikama različitih populacija. Razlike u senzibilizaciji alergenima jabuke, odnosno njihovim homolozima, najuočljivije su između područja sjeverne i centralne Europe (gdje je dominantna veza Bet v 1–Mal d 1) i Mediteranskog područja (u kojima dominira veza Pru p 3–Mal d 3) (29).

U zemljama sjeverne i centralne Europe, do senzibilizacije dovodi uglavnom pelud breze. Međutim, različita ekspresija pojedinačnih alergena peludi breze uvjetuje određene razlike u profilu senzibilizacije čak i između stanovnika ovih zemalja (52). Tako je senzibilizacija na Bet v 1 (glavni alergen) među bolesnicima preosjetljivim na pelud breze prisutna gotovo redovito (98-100%) u stanovnika Finske, Švedske i Austrije, nešto manje (85-90%) u stanovnika Francuske i Slovenije, a još manje (<65%) u stanovnika Švicarske i sjeverne Italije (52, 53, 54). Senzibilizacija na Bet v 2 (profilin) rijetko je prisutna u stanovnika Skandinavskih zemalja (<12%), nešto više u stanovnika zemalja centralne Europe (20-30%), a najviše u stanovnika Švicarske i sjeverne Italije (43-45%) (52, 53, 54). Senzibilizacija na Bet v 4 (polkalcin) nije pokazala značajnih razlika između ispitanih populacija (52, 54). U području sjeverne Italije breza je tek relativno nedavno (1980-ih godina) postala popularna ukrasna biljka i "novi" izvor potentnih alergena (55). Osim breze, važni izvori alergena u tom području su maslina i trave. Njihove peludi ne sadrže Bet v 1-homologe.

Međutim, obje vrste peludi sadrže profiline (Ole e 2, Phl p 12) homologne s Bet v 2 i polkalcine (Ole e 3, Phl p 7) homologne s Bet v 4. Manja učestalost Bet v 1-reaktivnosti i veća učestalost Bet v 2-reaktivnosti u stanovnika Švicarske i sjeverne Italije pokazuje da je dio tih bolesnika primarno senzibiliziran upravo alergenima iz tih dodatnih izvora (52).

U Mediteranskim zemljama senzibilizacija može nastati inhalacijskim ili oralnim putem. Reaktivnost IgE protutijela prema pojedinačnim alergenima peludi breze dokazana je za Bet v 1 u 40%, za Bet v 2 u 50% i za Bet v 4 u 23% bolesnika s područja južne Italije (56). Primarna senzibilizacija se zbog odsutnosti breza pripisuje izloženosti drugim vrstama peludi. Reaktivnost prema Bet v 1 posljedica je izloženosti Bet v 1-homolozima prisutnim u peludima drugih stabala reda Fagales. Jedan od važnijih kandidata je hrast crnika (*Quercus ilex*), široko rasprostranjen u centralnom dijelu Španjolske (29). Reaktivnost prema panalergenima Bet v 2 i Bet v 4 posljedica je izloženosti njihovim homolozima prisutnim u peludima različitih biljnih vrsta (56). Najznačajniji izvori su javorolisna platana (*Platanus acerifolia*), često korištena kao ukrasno stablo (57) te različite vrste trava i korova. U serumima bolesnika iz južne Italije i Španjolske često se mogu dokazati LTP-reaktivna IgE protutijela. Njihov nastanak uglavnom je posljedica primarne oralne senzibilizacije na Pru p 3 (LTP breskve).

Otvoreno je pitanje zašto se senzibilizacija na LTP događa u Mediteranskom području, ali ne i u zemljama sjeverne i centralne Europe. Smatra se da ekspozicija breskvi i nekim vrstama peludi (platana, pelin) u ranoj životnoj dobi povećava rizik ovakve senzibilizacije, dok ga ekspozicija Bet v 1-homolozima smanjuje (29). Nadalje, upitno je može li kontinuirana konzumacija

jabuke ili breskve unatoč blagim simptomima posredovanim senzibilizacijom na Bet v 1 povećati rizik dodatne senzibilizacije na LTP (58).

Kliničke manifestacije alergije na jabuku direktan su odraz profila senzibilizacije. U zemljama sjeverne i centralne Europe tipična je pojava simptoma OAS-a (svrbež, peckanje i/ili otok usana, jezika i/ili usne šupljine, osjećaj stezanja u grlu) ubrzo nakon ingestije. Mal d 1, kao inkompletni nutritivni alergen, dovodi do pojave simptoma u bolesnika prethodno senzibiliziranih na Bet v 1 iz peludi breze (nutritivna alergija tipa II) (39, 59). U Mediteranskim zemljama simptomi OAS-a mogu biti tek inicijalni (ili mogu potpuno izostati), a nakon njih često slijedi sistemska manifestacija (urtikarija/angioedem, gastrointestinalni simptomi, astma, anafilaktički šok). Simptomi lokalizirani na početni dio probavnog sustava izazvani su inkompletnim alergenima Mal d 1 i/ili Mal d 4 zbog senzibilizacije Bet v 1-homolozima i/ili profilinima (nutritivna alergija tipa II), dok je za sistemske reakcije odgovoran kompletni alergen Mal d 3 zbog senzibilizacije na LTP (nutritivna alergija tipa I) (21, 26, 27).

Količina alergena iz biljnih namirnica potrebna da izazove alergijsku reakciju može biti vrlo mala. Opisan je slučaj OAS-a nakon poljupca partnera koji je neposredno prije pojeo jabuku (60), ali i nekoliko slučajeva gdje su nakon poljupca (kojem je prethodila konzumacija kikirikija ili orašastih plodova) simptomi vezani uz oralnu sluznicu bili praćeni sistemskim reakcijama (61).

Senzibilizacija na ubikvitarne biljne alergene kao što su profilini i križno-reaktivne ugljikohidratne determinante (CCD - cross-reactive carbohydrate determinants) dovodi do ekstenzivnih križnih reakcija, koje su često klinički irelevantne. Takvi alergeni nazivaju se panalergenima, a senzibilizacija na neki od njih (pri čemu se točan izvor koji je do senzibilizacije doveo obično ne može

utvrditi) naziva se peludnom panalergijom (3). Izvori senzibilizacije panalergenima su različite vrste peludi (za CCD i otrovi insekata reda Hymenoptera), a njihovo prepoznavanje u hrani biljnog podrijetla posljedica je križne reaktivnosti stvorenih IgE protutijela (62, 63, 64).

Odsutnost klinički relevantnih alergijskih reakcija na profilin objašnjava se djelovanjem α -kimaze iz mastocita, koja cijepa pojedine regije profilina koje sadrže IgE-reaktivne epitope i tako limitira efektorske mehanizme alergijskog odgovora na profilin u senzibiliziranih bolesnika (65). Taj je mehanizam vjerojatno primarno usmjeren protiv nastanka autoimunosti (profilin u humanim stanicama). Dio objašnjenja mogao bi biti i u postojanju slabije alergogenih linearnih epitopa (66). Odsutnost klinički relevantnih reakcija na CCD objašnjava se njihovom monovalentnošću kao antigena, odnosno nesposobnošću premoštavanja IgE protutijela na mastocitima i posljedične degranulacije (3).

DIJAGNOSTIKA ALERGIJE NA JABUKU

Dijagnostički testovi za dokazivanje alergije na jabuku obuhvaćaju kožne i *in vitro* testove, kojima se potvrđuje postojanje senzibilizacije odnosno određuje profil senzibilizacije na pojedine alergene te provokativne testove, kojima se ispituje klinička značajnost dokazane senzibilizacije.

Potvrda i određivanje profila senzibilizacije - kožni i *in vitro* testovi

Velik problem u dijagnostici predstavlja nestabilnost alergenskih ekstrakata jabuke. Alergogenost proteina može se smanjiti već u procesu ekstrakcije, a dodatno se smanjuje i kasnije tijekom skladištenja. Klasičnim tehnikama ekstrakcije nemoguće je izolirati proteine jabuke u nativnom obliku. Razlog tome je prisustvo fenolovih spojeva, koji ubrzo nakon ekstrakcije stvaraju ireverzibilne kovalentne veze s proteinima i tako ih denaturiraju. Dodatkom inhibitora reakcije protein-fenol u medij za ekstrakciju, znatno je smanjen gubitak alergogenosti tijekom tog procesa (67). Daljnja poboljšanja tehnike ekstrakcije, primjenom niske temperature i acetona (68), precipitacijom u organskim otapalima uz primjenu inhibitora enzima (69), brzim zamrzavanjem ekstrahiranog soka jabuke (70), ekstrakcijom samo kore umjesto cijele jabuke (71), omogućila su dobivanje ekstrakata prikladnih za *in vivo* i *in vitro* testiranje. Nažalost, ovakvi ekstrakti i dalje su jako osjetljivi na uvjete skladištenja. Potrebno ih je čuvati u liofiliziranom obliku na -20°C , a za nešto duže čuvanje na $+4^{\circ}\text{C}$ u obliku otopine za *in vivo* testove potreban je i dodatak različitih stabilizatora (69, 72).

Pri izradi alergenskih ekstrakata i samom testiranju treba voditi računa i o varijabilnosti distribucije pojedinih alergena unutar ploda jabuke (73, 74). Mal d 1 i Mal d 2 jednoliko su raspodijeljeni po srži, a prisutni su i u kori. Mal d 3 prisutan je isključivo u kori. Ukupna količina Mal d 1, kao i njena raspodijela između srži i kore, pokazuju varijabilnost čak i između pojedinih plodova jabuke iste sorte (74).

Kožnim testovima detektiraju se specifična IgE protutijela *in vivo*, u koži senzibiliziranih bolesnika. Komercijalni alergenski ekstrakti jabuke često daju lažno negativne rezultate te se većina autora slaže da je za potvrdu senzibilizacije u bolesnika s nutritivnom alergijom tipa II primjeren test svježim plodom jabuke

(75, 13, 76, 77, 71, 78, 79). Najčešće korištene sorte za testiranje u ovoj populaciji su Granny Smith i Golden Delicious, koje su se zbog visokog relativnog udjela Mal d 1 pokazale kao najalergogenije. U bolesnika s nutritivnom alergijom tipa I, bolji se rezultati testiranja dobivaju ispravno pripremljenim ekstraktom kore jabuke (78) ili purificiranim LTP-om (25). Zbog visokog relativnog udjela Mal d 3, za izradu ekstrakata kojima će se testirati ovi bolesnici preporučena je sorta Starking (45).

Od *in vitro* testova najčešće se koriste RAST (radio allerge sorbent test) i njegove inačice, kojima se detektiraju specifična IgE protutijela u serumu senzibiliziranih bolesnika. Problem osjetljivosti testa ovdje je znatno manji, jer se pri ekstrakciji alergena mogu koristiti određeni inhibitori enzima koji bolje inhibiraju denaturaciju, ali nisu za *in vivo* upotrebu. Međutim, kod *in vitro* testova javlja se problem specifičnosti, odnosno mogućih lažno pozitivnih rezultata. Problem nastaje budući da se ovim testovima mogu detektirati IgE protutijela stvorena protiv križno-reaktivnog alergena (najčešće profilina i CCD) koja ne dovode do klinički značajne alergijske reakcije (11).

Postojanje križne reaktivnosti dokazuje se inhibicijskim testovima. Ukoliko dva alergena imaju strukturno slične epitope, nakon inkubacije seruma bolesnika s jednim alergenom dolazi do djelomične ili potpune inhibicije vezanja IgE protutijela s drugim alergenom. Najčešće korišteni test je RAST inhibicija (80, 67, 81, 82).

Kožni i *in vitro* testovi vrijedni su dijagnostički parametri, pogotovo ako se koriste u kombinaciji s anamnestičkim podacima. Učinkovitost kožnih testova svježom jabukom u detekciji bolesnika s OAS-om dostiže do >90%, a *in vitro* testova do >70% (77, 79, 83). Međutim, varijacije u ekspresiji Mal d 1 između pojedinih sorti i stupnjeva maturacije jabuka i dalje predstavljaju problem (79).

S ciljem kvalitetnijeg dizajniranja individualnih imunoterapijskih protokola, u novije vrijeme nastoji se što točnije odrediti profil senzibilizacije, odnosno detektirati sve komponente određenog izvora alergena koje su dovele do produkcije specifičnih IgE protutijela. Pri postavljanju ove "component-resolved" dijagnoze pomažu rekombinantni alergeni (84, 85, 86). Budući da je za senzibilizaciju bolesnika s nutritivnom alergijom tipa II na jabuku odgovorna pelud breze, važno je detektirati IgE reaktivnost na njene alergene Bet v 1 i Bet v 2 (87, 88, 59). Detekciju spektra IgE reaktivnosti dobro je proširiti i na druge alergene peludi breze - Bet v 4 (52, 54), Bet v 6 (89, 90), Bet v 8 (91) te na CCD (92, 93, 63). Pritom molekule Bet v 2, Bet v 4 i CCD treba shvatiti kao markere peludne panalergije budući da mogu potjecati iz različitih izvora (62, 56).

Klinička značajnost senzibilizacije - provokativni testovi

Klinički manifestne reakcije pri ingestiji jabuke javljaju se u oko 75% bolesnika preosjetljivih na pelud breze (9, 26). Uglavnom se radi o simptomima OAS-a, čiji se intenzitet može pojačati za vrijeme sezone polinacije (94). Dijagnozu je obično lako postaviti na temelju anamnestičkih podataka, kožnih i *in vitro* testova. Međutim, ponekad su anamnestički podaci nekonzistentni, a testovi su sami po sebi loši prediktori kliničke reaktivnosti (77), odnosno mogu biti pozitivni zbog križne reaktivnosti koja se nakon ingestije jabuke neće manifestirati simptomima. U tom slučaju potrebno je dijagnozu potvrditi oralnim provokativnim testom (95). Provokativni test je potrebno učiniti i u bolesnika s anamnestičkim podatkom o klinički manifestnoj reakciji na neko drugo voće iz porodice Rosaceae, ako su kožni i *in vitro* testovi pozitivni (96).

Provokativni testovi hranom mogu se izvoditi na više načina, a dvostruko slijepa placebo kontrolirana provokacija hranom (DBPCFC - double-blind placebo-controlled food challenge) generalno se smatra referentnom metodom (97). Za DBPCFC okus i miris hrane potrebno je "maskirati" određenim alergološki inaktivnim sastojcima, što je kod jabuke otežano jer različite vrste procesiranja mogu znatno utjecati na njenu alergogenost. Već samim čuvanjem narezane jabuke na sobnoj temperaturi postupno se gubi potentnost alergena (98). Pojedini autori razradili su DBPCFC modele u kojima se koristi svježa naribana jabuka (99, 94, 100, 101) ili liofilizirani prah jabuke (99). Ovi su modeli pogodni za znanstvena ispitivanja ili kliničke studije, ali prekomplikirani za svakodnevnu alergološku praksu.

U većini slučajeva, u praksi je prihvatljiva metoda otvorene oralne provokacije svježom jabukom (77, 26, 95). Kao jedna zanimljiva metoda, predloženo je izvođenje oralne provokacije poljupcem partnera koji je neposredno prije jeo jabuku. Test je nazvan jednostruko slijepa placebo kontrolirana provokacija hranom putem poljupca (SBPCKFC - single-blind placebo-controlled kiss food challenge) (60).

Izvođenje oralne provokacije jabukom vezano je s još nekim teškoćama. Povremeno se javlja tahifilaksija, odnosno izostajanje odgovora nakon uzastopnih provokacija (99). Također, kao kod kožnih i *in vitro* testova, postoji problem izbora jabuke obzirom na razlike u alergogenosti pojedinih sorti i stupnjeva maturacije. Spomenute teškoće znatno otežavaju standardizaciju oralnih provokativnih testova (102, 95) te za sada rezultiraju nedostatkom konzistentnog standardiziranog modela. Naša istraživačka grupa nedavno je osmislila novi sustav bodovanja težine reakcije u oralnom provokativnom testu (103) koji bi mogao pomoći pri rješavanju problema standardizacije.

LIJEČENJE ALERGIJE NA JABUKU

Terapijski modaliteti koje suvremena alergologija nudi za liječenje alergije na hranu biljnog podrijetla su eliminacijska dijeta te u određenim slučajevima specifična imunoterapija.

Eliminacijska dijeta

Eliminacija jabuke iz prehrane terapija je izbora za bolesnike s povećanim rizikom težih anafilaktičkih reakcija nakon njene ingestije. To su uglavnom bolesnici s preosjetljivošću na neko od voća iz porodice Rosaceae bez pridružene polinoze. Zbog visokog stupnja klinički irelevantne križne reaktivnosti među voćem ove porodice, savjet o eliminaciji trebao bi se bazirati na pozitivnom oralnom provokativnom testu, a ne samo na pozitivnim kožnim i *in vitro* testovima (104). Eliminacijsku dijetu moguće je provoditi i jednostavnim guljenjem jabuke, budući da se Mal d 3 koji je odgovoran za pojavu simptoma u ovih bolesnika, nalazi isključivo u kori (74). Velik problem u provođenju eliminacijske dijeta su "skriveni alergeni", koji se mogu naći u industrijski prerađenoj hrani u malim količinama. Mal d 3 bi zbog svoje termostabilnosti mogao biti takav alergen. Ovaj se problem nastoji riješiti zakonskim regulativama koje obvezuju proizvođače na ispravno označavanje proizvoda, pri čemu svi potencijalni alergogeni sastojci moraju biti jasno istaknuti (105, 106, 107).

Bolesnicima s nutritivnom alergijom tipa II obično se preporučuje konzumacija termički obrađenih jabuka, koje zbog termolabilnosti Mal d 1 neće

dovesti do pojave simptoma (74). Ovdje se, kao i kod bolesnika koji nastavljaju s konzumacijom unatoč blagim simptomima OAS-a, postavlja pitanje dodatne senzibilizacije na LTP (58). U novije vrijeme dokazano je da čak i nakon termičke obrade, koja dovodi do denaturacije trodimenzionalne strukture, termolabilni alergeni mogu utjecati na imunološki sustav. Iako zbog nestanka konformacijskih epitopa nema rane klinički manifestne reakcije nakon ingestije, linearni epitopi i dalje mogu stimulirati specifične T limfocite. Posljedično, moguća je pojava kasne alergijske reakcije (npr. pogoršanje simptoma atopijskog dermatitisa). Također se smatra da se ovakvom stimulacijom podržava produkcija pelud-specifičnih IgE protutijela izvan sezone polinacije, kada nema kontakta s uzročnim alergenom (108).

Specifična imunoterapija

Princip je specifične imunoterapije (SIT), modulacija imunološkog odgovora senzibilizirane osobe primjenom uzročnog alergena. Primjena adekvatno standardiziranih ekstrakata peludi breze, vrlo je učinkovita u liječenju polinoze te brzo dovodi do redukcije respiratornih simptoma. Budući da je OAS induciran jabukom također posljedica senzibilizacije na pelud breze, očekivalo se da će specifična imunoterapija ekstraktima peludi breze i ovdje biti učinkovita. Međutim, studije koje su se bavile ovim pitanjem dale su proturiječne rezultate.

Ranije studije (109, 110) pokazale su slabu učinkovitost SIT-a u redukciji simptoma OAS-a. U kasnijim studijama učinkovitost je bila bolja. U studiji talijanskih autora (111), u 84% bolesnika preosjetljivih na pelud breze došlo je do znatne redukcije ili potpunog nestanka simptoma OAS-a induciranih

jabukom, već nakon godinu dana liječenja. Praćenje ovih bolesnika pokazalo je da učinak perzistira dvije i pol godine po završenoj terapiji u >50% slučajeva (112). U studiji Nizozemskih autora (100), do redukcije simptoma OAS-a induciranih jabukom došlo je u 69% bolesnika preosjetljivih na pelud breze, a uz to se značajno smanjila i kožna reaktivnost na pelud breze, jabuku, Bet v 1 i Mal d 1. U studiji Švicarskih autora (113), u 87% bolesnika liječenih SIT-om kroz godinu dana, količina jabuke koju su mogli pojesti bez pojave simptoma znatno se povećala u odnosu na količinu koju su tolerirali prije početka terapije. Iako je porast bio statistički značajan, prosječna količina jabuke koju su liječeni bolesnici tolerirali i dalje je bila relativno mala pa autori zaključuju da je učinak imunoterapije u liječenju OAS-a ograničen. Retrospektivna analiza prikazanih studija (114) pokazala je da su u studijama sa slabijim učinkom SIT-a na simptome OAS-a (109, 110, 100, 113), primjenjene niže doze Bet v 1. U studiji s najboljim učinkom (111), primjenjene doze Bet v 1 u većine bolesnika bile su više. Razlike u primjenjenim dozama Bet v 1 proizlaze iz razlika u alergenskom sastavu ekstrakata različitih proizvođača te razlika u protokolu po kojem se provodio SIT. Rezultati ove analize ukazuju na mogućnost da je za postizanje učinka SIT-a na simptome OAS-a potrebna veća doza alergena u odnosu na dozu kojom se postiže zadovoljavajući učinak na respiratorne simptome (114).

Opisani slučaj 37-godišnjeg muškarca s multiplom senzibilizacijom na različite vrste peludi i simptomima OAS-a induciranog bilo kojom vrstom svježeg voća ili povrća (115), pokazuje da SIT može biti učinkovit način liječenja OAS-a čak i kada su uzrok biljni panalergeni. Bolesnik je liječen s dvije mješavine alergenskih ekstrakata: pelud 15 različitih stabala u jednoj te pelud 4 trave, 5 korova, 2 plijesni i 2 grinje u drugoj. Nakon 8 mjeseci terapije, slučajno je pojeo komadić svježe jabuke u salati, nakon čega se nisu pojavili simptomi

OAS-a. Potom je oralnim provokacijama potvrđeno da više nema klinički manifestnih reakcija niti nakon ingestije drugih vrsta voća i povrća.

Alergeni za SIT, za sada su dostupni samo u obliku alergenskih ekstrakata. Iako dobro standardizirani, oni osim glavne komponente (Bet v 1) sadrže i niz drugih alergena (Bet v 2, Bet v 4, itd.), koji ponekad u tijeku terapije mogu dovesti do senzibilizacije i tako stvoriti mogućnost novih križnih reaktivnosti (85, 116). Zbog toga se ispituju novi oblici imunoterapije kojima bi se u budućnosti liječenje provodilo ciljano i sa što manje nuspojava. Jedan od njih je mutirani Mal d 1, koji je u *in vivo* testovima, uključujući i oralnu provokaciju, pokazao znatno smanjenje alergogenosti u odnosu na nemutirani (101). Drugi oblici imunoterapije koji se trenutno ispituju su peptidna imunoterapija, DNA imunizacija, imunizacija imunostimulirajućim sekvencama te anti-IgE imunoterapija (117).

ZAKLJUČAK

Senzibilizacija na alergene prisutne u svježem voću i povrću je kompleksna. U zemljama sjeverne i centralne Europe do senzibilizacije dovode inhalacijski alergeni, a njihovi homolozi u hrani odgovorni su za pojavu simptoma OAS-a (nutritivna alergija tipa II). U Mediteranskom području, osobe se mogu senzibilizirati i primarnim alergenima biljnih namirnica, koji u ponovnom kontaktu dovode do pojave sistemskih reakcija (nutritivna alergija tipa I). Stoga je u osoba s alergijom na namirnice biljnog podrijetla potreban oprez zbog mogućnosti pojave čak i najtežih oblika anafilaktičkih reakcija.

Nestabilnost alergenskih ekstrakata, varijabilnost alergenskog sastava biljnih namirnica te česte klinički irelevantne križne reakcije, znatno otežavaju standardizirano izvođenje dijagnostičkih testova.

Eliminacijska dijeta često je jedina učinkovita terapijska opcija. Učinkovitost specifične imunoterapije ekstraktom peludi breze na simptome OAS-a još je uvijek predmet rasprave.

LITERATURA

1. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 27-36
2. Sicherer SH. Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 881-90
3. Yagami T. Allergies to cross-reactive plant proteins. Latex-fruit syndrome is comparable with pollen-food allergy syndrome. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128: 271-9
4. Aalberse RC, Akkerdaas JH, van Ree R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* 2001; 56: 478-90
5. Aalberse RC, Kleine Budde I, Stapel SO, van Ree R. Structural aspects of cross-reactivity and its relation to antibody affinity. *Allergy* 2001; 56 (Supl. 67): 27-9
6. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 228-38
7. Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, Wopfner N, Mari A. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy* 2004; 59: 243-67
8. Breiteneder H, Mills ENC. Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 14-23
9. Ebner C, Birkner T, Valenta R i sur. Common epitopes of birch pollen and apples – Studies by Western and Northern blot. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 588-94
10. Fritsch R, Bohle B, Vollmann U i sur. Bet v 1, the major birch pollen allergen, and Mal d 1, the major apple allergen, cross-react at the level of allergen-specific T helper cells. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 679-86

11. Hoffmann-Sommergruber K and the SAFE consortium. The SAFE project: “plant food allergies: field to table strategies for reducing their incidence in Europe” an EC-funded study. *Allergy* 2005; 60: 436-42
12. Eriksson NE. Food sensitivity reported by patients with asthma and hay fever. A relationship between food sensitivity and birch pollen-allergy and between food sensitivity and acetylsalicylic acid intolerance. *Allergy* 1978; 33: 189-96
13. Ortolani C, Ispano M, Pastorello EA, Bigi A, Ansaloni R. The oral allergy syndrome. *Ann Allergy* 1988; 61(Part Two): 47-52
14. Fernández-Rivas M, van Ree R, Cuevas M. Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 728-33
15. Vieths S, Janek K, Aulepp H, Petersen A. Isolation and characterisation of 18 kD major apple allergen and comparison with the major birch pollen allergen (Bet v 1). *Allergy* 1995; 50: 421-30
16. Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Laimer da Câmara Machado M i sur. Cloning and sequencing of Mal d 1, the major allergen from apple (*Malus domestica*), and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214: 538-51
17. Breiteneder H. Thaumatin-like proteins – a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy* 2004; 59: 479-81
18. Cortegano I, Civantos E, Aceituno E i sur. Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment. *Allergy* 2004; 59: 485-90

19. Hsieh L, Moos M, Lin Y. Characterization of apple 18 and 31 kD allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 960-70
20. Hoffmann-Sommergruber K. Pathogenesis-related (PR) proteins identified as allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 930-5
21. Sánchez-Monge R, Lombardero M, García-Sellés FJ, Barber D, Salcedo G. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 514-9
22. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D i sur. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 122: 20-32
23. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D i sur. Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy* 2002; 57: 900-6
24. Díaz-Perales A, Lombardero M, Sánchez-Monge R i sur. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and *Rosaceae* fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1403-10
25. García-Sellés FJ, Díaz-Perales A, Sánchez-Monge R i sur. Patterns of reactivity to lipid transfer proteins of plant foods and *Artemisia* pollen: an *in vivo* study. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128: 115-22
26. Pastorello EA, Pravettoni V, Farioli L i sur. Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 1099-106
27. Ballmer-Weber BK. Lipid transfer protein as a potential panallergen? *Allergy* 2002; 57: 873-5

28. Wensing M, Akkerdaas JH, van Leeuwen WA i sur. IgE to Bet v 1 and profilin: cross-reactivity patterns and clinical relevance. J Allergy Clin Immunol 2002; 110: 435-42
29. Fernández-Rivas M, Bolhaar S, Gonzáles-Mancebo E i sur. Apple allergy across Europe: How allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. J Allergy Clin Immunol 2006; 118: 481-8
30. Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, O’Riordain G i sur. Molecular characterization of Api g 1, the major allergen of celery (*Apium graveolens*), and its immunological and structural relationships to a group of 17-kDa tree pollen allergens. Eur J Biochem 1995; 233: 484-9
31. Scheurer S, Metzner K, Haustein D, Vieths S. Molecular cloning, expression and characterization of Pru a 1, the major cherry allergen. Mol Immunol 1997; 34: 619-29
32. Hoffmann-Sommergruber K, O’Riordain G, Ahorn H i sur. Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross-reactivity with Bet v 1 and Api g 1. Clin Exp Allergy 1999; 29: 840-7
33. Karamloo F, Scheurer S, Wangorsch A, May S, Haustein D, Vieths S. Pyr c 1, the major allergen from pear (*Pyrus communis*), is a new member of the Bet v 1 allergen family. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001; 25: 281-93
34. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V i sur. The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. J Allergy Clin Immunol 1999; 103: 520-6

35. Pastorello EA, D'Ambrosio FP, Pravettoni V i sur. Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 371-7
36. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V i sur. Characterization of the major allergen of plum as a lipid transfer protein. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 756: 95-103
37. Scheurer S, Pastorello EA, Wangorsch A, Kästner M, Haustein D, Vieths S. Recombinant allergens Pru av 1 and Pru av 4 and a newly identified lipid transfer protein in the *in vitro* diagnosis of cherry allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 724-31
38. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V i sur. The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 744-51
39. Valenta R, Kraft D. Type 1 allergic reactions to plant-derived food: a consequence of primary sensitization to pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 893-5
40. Bauer L, Ebner C, Hirschwehr R i sur. IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: immunoblot investigation of the birch-mugwort-celery syndrome. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 1161-70
41. Crespo JF, Rodriguez J. Food allergy in adulthood. *Allergy* 2003; 58: 98-113
42. Paštar Z, Lipozenčić J. Adverse reactions to food and clinical expressions of food allergy. *Skinmed* 2006; 5: 119-25

43. Vieths S, Jankiewicz A, Schöning B, Aulepp H. Apple allergy: the IgE-binding potency of apple strains is related to the occurrence of the 18-kDa allergen. *Allergy* 1994; 49: 262-71
44. Son DY, Scheurer S, Hoffmann A, Haustein D, Vieths S. Pollen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Eur J Nutr* 1999; 38: 201-15
45. Carnés J, Ferrer A, Fernández-Caldas E. Allergenicity of 10 different apple varieties. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 96: 564-70
46. Vieths S, Schöning B, Jankiewicz A. Occurrence of IgE binding allergens during ripening of apple fruits. *Food Agric Immunol* 1993; 5: 93-105
47. Oh DH, Song KJ, Shin YU, Chung WI. Isolation of a cDNA encoding a 31-kDa, pathogenesis-related 5/thaumatin-like (PR5/TL) protein abundantly expressed in apple fruit (*Malus domestica* cv. Fuji). *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64: 355-62
48. Midoro-Horiuti T, Brooks EG, Goldblum RM. Pathogenesis-related proteins of plants as allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 87: 261-71
49. Pühringer H, Moll D, Hoffmann-Sommergruber K, Watillon B, Katinger H, Laimer da Câmara Machado M. The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Science* 2000; 152: 35-50
50. Krebitz M, Wagner B, Ferreira F i sur. Plant-based heterologous expression of Mal d 2, a thaumatin-like protein and allergen of apple (*Malus domestica*), and its characterization as an antifungal protein. *J Mol Biol* 2003; 329: 721-30

51. Gilissen LJWJ, Bolhaar STHP, Matos CI i sur. Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 364-9
52. Movérare R, Westritschnig K, Svensson M i sur. Different IgE reactivity profiles in birch pollen-sensitive patients from six European populations revealed by recombinant allergens: an imprint of local sensitization. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128: 325-35
53. Ulčar-Kostič S, Košnik M, Silar M. Diagnostic of crossreactivity between birch pollen and apple with recombinant allergens. *Allergy* 2001; 56 (Supl. 68): 212. Abstract of the 20th Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology; 9-13 May 2001, Berlin
54. Rossi RE, Monasterolo G, Monasterolo S. Detection of specific IgE antibodies in the sera of patients allergic to birch pollen using recombinant allergens Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4: evaluation of different IgE reactivity profiles. *Allergy* 2003; 58: 929-32
55. Asero R. Birch and ragweed pollinosis north of Milan: a model to investigate the effects of exposure to "new" airborne allergens. *Allergy* 2002; 57: 1063-6
56. Mari A, Wallner M, Ferreira F. Fagales pollen sensitization in a birch-free area: a respiratory cohort survey using Fagales pollen extracts and birch recombinant allergens (rBet v 1, rBet v 2, rBet v 4). *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1419-28
57. Enrique E, Cisteró-Bahíma A, Bartolomé B i sur. *Platanus acerifolia* pollinosis and food allergy. *Allergy* 2002; 57: 351-6

58. Herndl A, Marzban G, Kolarich D i sur. Mapping of *Malus domestica* allergens by 2-D electrophoresis and IgE-reactivity. *Electrophoresis* 2007; 28: 437-48
59. Kazemi-Shirazi L, Pauli G, Purohit A i sur. Quantitative IgE inhibition experiments with purified recombinant allergens indicate pollen-derived allergens as the sensitizing agents responsible for many forms of plant food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 116-25
60. Wüthrich B. Oral allergy syndrome to apple after a lover's kiss. *Allergy* 1997; 52: 235-6
61. Hallett R, Haapanen LAD, Teuber SS. Food allergies and kissing. *N Engl J Med* 2002; 346: 1833-4
62. Mari A. Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 125: 57-65
63. van Ree R. Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 129: 189-97
64. Ebo D, Hagendorens M, Bridts C, De Clerck L, Stevens W. Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein profilin: mimickers of allergy. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 137-44
65. Mellon MB, Frank BT, Fang KC. Mast cell alpha-chymase reduces IgE recognition of birch pollen profilin by cleaving antibody-binding epitopes. *J Immunol* 2002; 168: 290-7
66. Wiedemann P, Giehl K, Almo SC i sur. Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody. *J Biol Chem* 1996; 271: 29915-21

67. Björkstén F, Halmeupuro L, Hannuksela M, Lahti A. Extraction and properties of apple allergens. *Allergy* 1980; 35: 671-7
68. Vieths S, Schöning B, Petersen A. Characterization of the 18-kDa apple allergen by two-dimensional immunoblotting and microsequencing. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 104: 399-404
69. Rudeschko O, Fahlbusch B, Henzgen M i sur. Investigation of the stability of apple allergen extracts. *Allergy* 1995; 50: 575-80
70. de Groot H, de Jong NW, Vuijk MH, Gerth van Wijk R. Birch pollinosis and atopy caused by apple, peach, and hazelnut; comparison of three extraction procedures with two apple strains. *Allergy* 1996; 51: 712-8
71. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Antoniotti P, Cislighi C, Falagiani P. A new apple extract. *Allergy* 1999; 54: 87-8
72. Vieths S, Hoffmann A, Holzhauser T, Müller U, Reindl J, Haustein D. Factors influencing the quality of food extracts for *in vitro* and *in vivo* diagnosis. *Allergy* 1998; 53 (Supl. 46): 65-71
73. Fernández-Rivas M, Cuevas M. Peels of Rosaceae fruits have a higher allergenicity than pulps. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 1239-47
74. Marzban G, Puehringer H, Dey R i sur. Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits. *Plant Science* 2005; 169: 387-94
75. Dreborg S, Foucard T. Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy* 1983; 38: 167-72
76. Ortolani C, Ispano M, Pastorello EA, Ansaloni R, Magri GC. Comparison of results of skin prick tests (with fresh foods and commercial food extracts) and RAST in 100 patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 683-90

77. Anhøj C, Backer V, Nolte H. Diagnostic evaluation of grass- and birch-allergic patients with oral allergy syndrome. *Allergy* 2001; 56: 548-52
78. Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Casarini M, Falagiani P. Allergy to nonspecific lipid transfer proteins in Rosaceae: a comparative study of different *in vivo* diagnostic methods. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 87: 68-71
79. Osterballe M, Scheller R, Stahl Skov P, Andersen KE, Bindslev-Jensen C. Diagnostic value of scratch-chamber test, skin prick test, histamine release and specific IgE in birch-allergic patients with oral allergy syndrome to apple. *Allergy* 2003; 58: 950-3
80. Lahti A, Björkstén F, Hannuksela M. Allergy to birch pollen and apple, and cross-reactivity of the allergens studied with the RAST. *Allergy* 1980; 35: 297-300
81. Løwenstein H, Eriksson NE. Hypersensitivity to foods among birch pollen-allergic patients. *Allergy* 1983; 38: 577-87
82. Halmeupuro L, Vuontela K, Kalimo K, Björkstén F. Cross-reactivity of IgE antibodies with allergens in birch pollen, fruits and vegetables. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984; 74: 235-40
83. Košnik M, Ulčar-Kostič S, Silar M. Are there regional differences in diagnostic tests accuracy for oral allergy syndrome? *Allergy* 2004; 59: 888
84. Vieths S, Scheurer S, Reindl J i sur. Optimized allergen extracts and recombinant allergens in diagnostic applications. *Allergy* 2001; 56 (Supl. 67): 78-82
85. Kazemi-Shirazi L, Niederberger V, Linhart B, Lidholm J, Kraft D, Valenta R. Recombinant marker allergens: diagnostic gatekeepers for the treatment of allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127: 259-68

86. Ballmer-Weber BK, Scheurer S, Fritsche P i sur. Component-resolved diagnosis with recombinant allergens in patients with cherry allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 167-73
87. Rossi RE, Monasterolo G, Operti D, Corsi M. Evaluation of recombinant allergens Bet v 1 and Bet v 2 (profilin) by Pharmacia CAP System in patients with pollen-related allergy to birch and apple. *Allergy* 1996; 51: 940-5
88. van Ree R, van Leeuwen WA, Akkerdaas JH, Aalberse RC. How far can we simplify *in vitro* diagnostics for Fagales tree pollen allergy? A study with three whole pollen extracts and purified natural and recombinant allergens. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 848-55
89. Wellhausen A, Schöning B, Petersen A, Vieths S. IgE binding to a new cross-reactive structure: a 35 kDa protein in birch pollen, exotic fruit and other plant foods. *Z Ernährungswiss* 1996; 35: 348-55
90. Karamloo F, Wangorsch A, Kasahara H i sur. Phenylcoumaran benzylic ether and isoflavonoid reductases are a new class of cross-reactive allergens in birch pollen, fruits and vegetables. *Eur J Biochem* 2001; 268: 5310-20
91. Mahler V, Fischer S, Heiss S, Duchêne M, Kraft D, Valenta R. cDNA cloning and characterization of a cross-reactive birch pollen allergen: Identification as a pectin esterase. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124: 64-6
92. Aalberse RC, Koshte V, Clemens JGJ. Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and Hymenoptera venom. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68: 356-64

93. van Ree R, Hoffman DR, van Dijk W i sur. Lol p XI, a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitor-related proteins. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 970-8
94. Skamstrup Hansen K, Vieths S, Vestergaard H, Skov PS, Bindslev-Jensen C, Poulsen LK. Seasonal variation in food allergy to apple. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 756: 19-32
95. Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U i sur. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods – position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 2004; 59: 690-7
96. Rodriguez J, Crespo JF, Lopez-Rubio A i sur. Clinical cross-reactivity among foods of the Rosaceae family. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 183-9
97. Bruijnzeel-Koomen C, Ortolani C, Aas K i sur. Position paper: Adverse reactions to food. *Allergy* 1995; 50: 623-35
98. Soler-Rivas C, Wichers HJ. Impact of (bio)chemical and physical procedures on food allergen stability. *Allergy* 2001; 56 (Supl. 67): 52-5
99. Skamstrup Hansen K, Vestergaard H, Stahl Skov P i sur. Double-blind, placebo-controlled food challenge with apple. *Allergy* 2001; 56: 109-17
100. Bolhaar ST, Tiemessen MM, Zuidmeer L i sur. Efficacy of birch-pollen immunotherapy on cross-reactive food allergy confirmed by skin tests and double-blind food challenges. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 761-9
101. Bolhaar STHP, Zuidmeer L, Ma Y i sur. A mutant of the major apple allergen, Mal d 1, demonstrating hypo-allergenicity in the target organ by double-blind placebo-controlled food challenge. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 1638-44

102. Bindslev-Jensen C. Standardization of double-blind, placebo-controlled food challenges. *Allergy* 2001; 56 (Supl. 67): 75-7
103. Pevec B, Stipić Marković A, Radulović Pevec M, Batišta I. A new scoring system for the assessment of the severity of oral allergic reactions after food challenge: Zagreb PEACE score. *Clinical Immunology* 2008; 127 (Supl.): S44 (Sažetak F.3.)
104. Crespo JF, Rodriguez J, James JM, Daroca P, Reaño M, Vives R. Reactivity to potential cross-reactive foods in fruit-allergic patients: implications for prescribing food avoidance. *Allergy* 2002; 57: 946-9
105. Eigenmann PA. Food allergy: a long way to safe processed foods. *Allergy* 2001; 56: 1112-3
106. Humières J, Wal JM. EU Regulation: What's new in terms of labelling of food allergens? *Allergy* 2004; 59: 1259-61
107. Mills ENC, Valovirta E, Madsen C i sur. Information provision for allergic consumers – where are we going with food allergen labeling? *Allergy* 2004; 59: 1262-8
108. Bohle B. The impact of pollen-related food allergens on pollen allergy. *Allergy* 2007; 62: 3-10
109. Möller C. Effect of pollen immunotherapy on food hypersensitivity in children with birch pollinosis. *Ann Allergy* 1989; 62: 343-5
110. Herrmann D, Henzgen M, Frank E, Rudeschko O, Jager L. Effect of hyposensitization for tree pollinosis on associated apple allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1995; 5: 259-67
111. Asero R. Effects of birch pollen-specific immunotherapy on apple allergy in birch pollen-hypersensitive patients. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 1368-73

112. Asero R. How long does the effect of birch pollen injection SIT on apple allergy last? *Allergy* 2003; 58: 435-8
113. Bucher X, Pichler WJ, Dahinden CA, Helbling A. Effect of tree pollen specific, subcutaneous immunotherapy on the oral allergy syndrome to apple and hazelnut. *Allergy* 2004; 59: 1272-6
114. Asero R. Effects of birch pollen SIT on apple allergy: a matter of dosage? *Allergy* 2004; 59: 1269-71
115. Kelso JM, Jones RT, Tellez R, Yunginger JW. Oral allergy syndrome successfully treated with pollen immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995; 74: 391-6
116. Modrzyński M, Zawisza E. Possible induction of oral allergy syndrome during specific immunotherapy in patients sensitive to tree pollen. *Med Sci Monit* 2005; 11: 351-5
117. Burks W, Bannon G, Lehrer SB. Classic specific immunotherapy and new perspectives in specific immunotherapy for food allergy. *Allergy* 2001; 56 (Supl. 67): 121-4

PLANT FOOD ALLERGY: APPLE AS A MODEL

B. PEVEC¹, M. RADULOVIĆ PEVEC¹, A. STIPIĆ MARKOVIĆ¹,

I. BATIŠTA²

¹ Department of clinical immunology, pulmonology and rheumatology

² Immunological laboratory

General Hospital "Sveti Duh"

Zagreb, Croatia

Summary

Allergic reactions to plant foodstuffs comprise a whole spectrum of clinical manifestations - from very mild ones, localized to the oral mucosa, to the most severe, including the life-threatening anaphylactic shock. The reason is the presence of a few structurally and functionally different allergens in each foodstuff. On the other hand, the similarity between particular allergens in different foodstuffs, and the presence of their homologues in other sources (pollens, insect venoms) give a lot of possibilities of cross-reactions during the allergic sensitization.

Apple has a significant place in human nutrition. However, it is also a fruit which most frequently causes allergic reactions. Apple allergens are well known and adequately characterized, and their homologues are present in other vegetable foodstuffs. Thus, apple represents a good model of plant food hypersensitivity.

The aim of this paper was to review the mechanisms of allergic sensitization, the types of clinical manifestations, the influence of allergen content variability, and the diagnostic and therapeutic issues connected with plant food allergy, using apple as a model.

Key words

food allergy, apple, Mal d 1, Mal d 3, plant food, cross-reactivity, sensitization profile, birch pollen