Učestalost genotipova ABO sustava krvnih grupa u oboljelih od tromboembolija u Hrvatskoj

Jukić, Irena

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:569749

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Irena Jukić

UČESTALOST GENOTIPOVA ABO SUSTAVA KRVNIH GRUPA U OBOLJELIH OD TROMBOEMBOLIJA U HRVATSKOJ

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.

UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND MEDICAL BIOCHEMISTRY

Irena Jukić

DISTRIBUTION OF ABO GENOTYPES AMONG PATIENTS WITH THROMBOEMBOLISM IN CROATIA

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Irena Jukić

UČESTALOST GENOTIPOVA ABO SUSTAVA KRVNIH GRUPA U OBOLJELIH OD TROMBOEMBOLIJA U HRVATSKOJ

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Jasna Bingulac Popović,
viša znanstvena suradnica

Zagreb, 2013.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF PHARMACY AND MEDICAL BIOCHEMISTRY

Irena Jukić

DISTRIBUTION OF ABO GENOTYPES AMONG PATIENTS WITH THROMBOEMBOLISM IN CROATIA

DOCTORAL THESIS

Mentor: Jasna Bingulac Popović, PhD

RESEARCH SCIENTIST

Zagreb, 2013.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva.

Rad je izrađen u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, Odjelu za molekularnu dijagnostiku.

Zahvaljujem mojoj mentorici ***dr. sc. Jasni Bingulac Popović,*** *višoj znanstvenoj suradnici iz Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu koja me svojim znanjem, iskustvom i savjetima stručno i mudro vodila tijekom izrade ovog rada.*

Hvala ***dr Vesni Đogić*** *i svim djelatnicima Odjela za molekularnu dijagnostiku za pomoć pri provođenju molekularnog testiranja kao i djelatnicima Odjela za prikupljanje krvi i njihovom voditelju* ***dr Čedomiru Maglovu*** *za prikupljanje uzoraka krvi davatelja.*

Zahvaljujem djelatnicima Kliničkog bolničkog centra „Sestara Milosrdnica“, Zavoda za transfuziju u Vinogradskoj i pri Klinici za tumore koji su mi pomogli u prikupljanju uzoraka krvi od bolesnika s akutnim infarktom i venskom trombozom, posebno prim. ***dr. sc. Deani Šturm*** *zbog stručnog i ljudskog poticanja za rad.*

Mr. sc. Ani Hećimović, dr med. *iz Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu zahvaljujem za pomoć pri statističkoj obradi rezultata.*

Svim mojim dragim prijateljima zahvaljujem na podršci koji su mi iskazivali tijekom rada i poticali me na njegov završetak.

Hvala i svim suradnicima u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu.

Posebno sam zahvalna mojoj obitelji za strpljenje i ljubav.

Ovaj doktorski rad posvećujem mojim dragim pokojnim roditeljima **Ančici** i **Josipu** koji su me odgojem usmjerili na najvažnije životne vrijednosti – ljubav i znanje.

SAŽETAK

Venske i arterijske tromboembolije su vaskularne bolesti koje nastaju uslijed genetske predispozicije i sekundarnih čimbenika. Tromboembolijske bolesti su veliki javnozdravstveni problem u Hrvatskoj, kao i u većini tranzicijskih europskih zemalja i jedan od vodećih uzroka mortaliteta populacije. Zbog toga je od velikog značenja utvrditi čimbenike rizika koji su uključeni u razvoj ovih bolesti, kako bi mogli spriječiti nastanak, ponavljanje trombotičkih epizoda i poboljšati liječenje. Istraživanja su pokazala veću ili manju povezanost između ABO krvne grupe i kardiovaskularnih, gastrointestinalnih, tumorskih i infektivnih bolesti. Poznato je da nositelji ne-O krvne grupe ABO sustava imaju povećani trombotički rizik**.** Razlika između O i ne-O KG je u razini glikoproteina von Willebrand u plazmi koja je za 25-30% niža kod osoba s O krvnom grupom, u odnosu na ne-O krvne grupe. Smatra se da je to posljedica izravnog funkcionalnog utjecaja ABO genskog lokusa, ali mehanizam nije razjašnjen.

Cilj istraživanja bio je utvrditi povezanost ABO genotipova i genetičkih protrombotičkih čimbenika kao genetičkih čimbenika rizika za razvoj tromboze (FV Leiden, protrombin G20210A i metilentetrahidrofolat reduktaza C677T) u hrvatskoj populaciji, kao glavnog simptoma u oboljelih od tromboembolija.

Istraživanjem je obuhvaćeno 164 bolesnika s venskom trombozom,182 bolesnika s arterijskom trombozom i 303 asimptomatska dobrovoljna davatelja krvi koji su predstavljali kontrolnu skupinu. Genotipizacija na 5 osnovnih alela (O1, O2, A1, A2, B) i 15 genotipova bila je izvedena pomoću PCR-SSP metode, protrombotičke mutacije načinjene su pomoću metoda PCR-SSP, PCR-RFLP i RT-PCR.

Dobiveni rezultati pokazuju povećani trombotički rizik kod ne-OO nositelja u odnosu na OO nositelje genotipova za razvoj tromboembolijskih bolesti koji iznosi OR 1,46; 95% CI : 1,06 – 2,02; $p<0,05$ .Rizik od venskih tromboembolija kod ne-OO KG statistički je još značajniji (OR 1,68; 95% CI : 1,12 – 2,53), a suprotno tome kod arterijskih nema statistički značajne razlike u pogledu trombotičkog rizika između ne-OO i OO nositelja. Utvrđen je veći rizik za oboljevanje od venskih tromboembolijskih bolesti kod nositelja genotipova O1B/O2B/BB i AB/A2B, a dokazana je i statistički značajno veća frekvecnija B alela u skupini bolesnika s venskom trombozom (0,16) nego u kontrolnoj skupini (0,11); $P<0,05$. Kod infarkta miokarda niti jedan ne-OO genotip ne povećava trombotički rizik. Mutacija FVL u skupini ne-OO nositelja povećava izglede za razvoj venske tromboze oko 9 puta, za nositelje MTHFR 677TT povećava ih za oko 4 puta, dok mutacija FII G20210A kod ne-OO nositelja kao čimbenik rizika nema značenje. Protrombotički genetički čimbenici niti u jednoj skupini ne doprinose povećanju rizika za razvoj arterijske tromboembolije. Incidencija tromboembolijskih bolesti kod žena statistički je značajno veća u odnosu na muškarce uz OR 1,43, a izgledi za razvoj venskih tromboembolija kod žena su čak 2,53 puta veći u odnosu na muškarce. Suprotno tome, nema statistički značajne razlike između spolova za pojavu akutnog infarkta. Dob je značajan čimbenik za razvoj infarkta miokarda kod osoba starijih od 55 godina (17,6 puta veći rizik).

Rezultati rada potvrdili su da osobe nositelji ne-OO genotipova ABO krvne grupe imaju povećani trombotički rizik u Republici Hrvatskoj. Rad predstavlja temelje za istraživanje ABO sustava krvnih grupa kao genetičkog čimbenika rizika za druge kardiovaskularne bolesti, kao i gastrointestinalne, tumorske i infektivne bolesti.

Ključne riječi: ABO krvne grupe, venske i arterijske tromboembolije, genetički čimbenici rizika za trombozu, ABO genotipovi, FV Leiden mutacija, protrombin G20210A mutacija, metilentetrahidrofolat reduktaza -C677T mutacija

SUMMARY

Venous thromboembolism (VTE) and coronary artery disease (CAD) are vascular diseases in which both inherited and acquired factors are involved. Cardiovascular diseases are important problem in Republic Croatia, as well in other European countries and one of leading cause of population mortality. It is of utmost importance to identify the risk factors implicated in the disease development and the candidates eligible for anticoagulant therapy to prevent recurrent thrombotic episodes.There have been reports on a lower or higher association between ABO blood groups and cardiovascular, tumour, gastrointestinal, and infectious diseases. Most studies performed to date have generally agreed that non-OO blood group carriers have a higher risk of thrombosis than OO blood group carriers. Differencies between O and non-O blood groups are in values of glycoprotein von Willebrand factor in plasma which is by 25-30% lower in O blood group than in non-O blood group. The hypothesis is that this occurs due to the direct functional impact of ABO locus; however, the exact mechanism has not yet been elucidated.

Aim of the study was to assess the association between ABO blood group genotypes and genetic risk factors for thrombosis (FV Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations) in the Croatian population and to determine whether genetic predisposition to thrombotic risk is higher in non-OO blood group genotypes than in OO blood group genotypes.

The study included 164 patients with VTE,182 patients with CAD and 303 asymptomatic blood donors as a control group. Genotyping to 5 common alleles (O1, O2, A1, A2, B) and 15 genotypes of ABO blood groups was performed by PCR-SSP and prothrombotic mutations were determined by PCR-SSP, PCR-RFLP and RT-PCR methods.

The results show higher thrombotic risk for non-OO carriers compared to OO genotype carriers for the development of thromboembolic diseases (OR 1.46; 95% CI : 1.0613 – 2.0238) $p<0,05$. VTE risk for non-OO blood group was higher (OR 1.68; 95% CI : 1.1147 – 2.5258), while there was no significant difference in the risk of arterial thrombosis between non-OO and OO- carriers. The strongest association with thrombotic risk was recorded for O1B/O2B/BB i AB/ A2B; and it has been proven statistically significant higher frequency of B allel (0,16) in the group with VTE than in the control group (0,11). There was no significant difference between genotypes in the risk of myocardial infarction. FV Leiden increased the risk of thrombosis 9-fold in the group of non-OO carriers, and fourfold in the group of MTHFR 677TT carriers, while there was no significant difference in the risk of thrombosis between OO and non-OO blood groups associated with prothrombin mutation. There was no contribution of prothrombotic genetic factors to risk for development of myocardial infarction. Incidence of thromboembolic diseases was statistically significant for women compared to men (OR 1.43), even higher in VTE studied group, 2.53 fold higher than in men. There was not found significant difference between genders for development of arterial disease. The age was established as significant factor for development myocardial infarction for patients older than 55 years (17.6 -fold higher risk).

Study results confirmed the association of non-OO blood group genotypes with an increased risk of thrombosis in Croatia. Study is basis for research of ABO blood group system as genetic risk factors for other cardiovascular diseases, as well as gastrointestinal, cancer and infectious diseases.

Key Words: ABO blood groups, venous and arterial thromboembolism, genetic thrombotic risk factors, ABO genotypes, FV Leiden, prothrombin G20210A mutation, metylenetetrahydrofolate reductase -C677T mutation

SADRŽAJ

1. UVOD……..…..1

1.1. Povijest otkrića ABO sustava krvnih grupa……....1

1.2. Eritrocitne krvne grupe……...2

1.3. Nasljeđivanje ABO sustava krvnih grupa……...5

1.4. Raspodjela ABO sustava krvnih grupa i evolucijski pokazatelji……7

1.5. ABO sustav krvnih grupa i bolesti……10

1.5.1. ABO sustav krvnih grupa i infekcije……...……11

1.5.2. ABO sustav krvnih grupa i tumorske bolesti……...……...11

1.5.3. Antigeni krvnih grupa u malignim bolestima……..…….....13

1.5.4. ABO sustav krvnih grupa i čimbenici VIII i Von Willebrand…...…..…14

1.5.5. Antigeni krvnih grupa i čimbenici rasta…….....…15

1.5.6. ABO sustav krvnih grupa i gastroduodenalne bolesti……..…...15

1.5.7. ABO sustav krvnih grupa i kardiovaskularne bolesti…….....16

1.6. Tromboembolijske bolesti…….…18

1.6.1. Podjela tromboembolijskih bolesti…….…19

1.6.2. Venske tromboze…….…….…….…..…19

1.6.2.1. Duboka venska tromboza…….…….…….…..20

1.6.3. Arterijska okluzivna bolest s aterosklerozom……..……...…21

1.6.3.1. Infarkt miokarda…….……...…….….22

1.7. Nasljedne trombofilije……...……22

1.7.1. Mutacije faktora zgrušavanja kao genetički čimbenici trombotičkih stanja…….…….....24

1.7.1.1. Točkasta mutacija faktor V Leiden (R506Q)…….…….……24

1.7.1.2. Protrombin (FII) G20210A mutacija……...26

1.7.1.3. C677T mutacija enzima metilentetrahidrofolat reduktaze…...27

2. OBRAZLOŽENJE TEME……...……28

2.1. Hipoteza……29

2.2. Ciljevi rada……...29

3. MATERIJALI I METODE……..30

3.1. MATERIJALI……..……30

3.1.1. Ispitanici…….……..…..…….…..…30

3.1.2. Uređaji i kemikalije.-…….……..…31

3.1.2.1. Laboratorijski uređaji…….……..32

3.1.2.2. Kemikalije i ostala pomoćna sredstva……. ...33

3.1.2.3. Otopine…….……....34

3.2. METODE……..……..…….34

3.2.1. Izolacija genomske DNA…….…….…….….....34

3.2.1.1. Izolacija genomske DNA iz leukocita periferne krvi pomoću silikatnih gel membrana …….……..…...34

3.2.1.2. Izolacija genomske DNA iz leukocita periferne krvi pomoću uređaja MagnaPur…….……....35

3.2.2. ABO genotipizacija pomoću PCR-SSP metode (alel specifični PCR)...35

3.2.3. Genetički faktori trombofilije…….……..…..…..….....41

3.2.3.1. Genotipizacija točkaste mutacije faktor V Leiden pomoću PCR-SSP metode…….…..…....41

3.2.3.2.Genotipizacija mutacija G20210A protrombin i C677T metilentetrahidrofolat reduktaze pomoću metode PCR-RFLP ……....43

3.2.3.3.Genotipizacija mutacija FV Leiden, G20210A protrombin i C677T metilentetrahidrofolat reduktaze pomoću metode real-time PCR …….…….....45

3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA……..…….48

4 REZULTATI ……...50

4.1. Rezultati usporedbe skupina bolesnika i kontrolne skupine……..50

4.2. Rezultati usporedbe skupine bolesnika s venskim tromboembolijama (A) i kontrolne skupine……...…..……..57

4.3. Rezultati usporedbe skupine bolesnika s arterijskim tromboembolijama-infarkt miokarda (B) i kontrolne skupine……...63

4.4. Rezultati usporedbe pojavnosti ABO alela u skupini bolesnika i kontrolnoj skupini……69

5. RASPRAVA……...……..…….72

6. ZAKLJUČCI…….88

7. LITERATURA……..89

8. ŽIVOTOPIS……105

1. UVOD

1.1. Povijest otkrića ABO sustava krvnih grupa

Krajem prošlog i početkom ovog stoljeća o krvnim grupama i njihovom značenju se sve više istražuje i piše. Njihovim postojanjem i poveznicama sa pojedinim područjima našeg zdravlja, navika i samog života bave se liječnici, biokemičari, biolozi, nutricionisti, psiholozi i sociolozi. U porastu je i znanstvena i popularna znatiželja, ali je većina istraživanja bazirana na fenotipskim podjelama krvnih grupa i to uglavnom ABO sustava. ABO sustav je najvažniji sustav krvnih grupa u transfuzijskoj i transplantacijskoj medicini, jer predstavlja imunološku barijeru protiv transfuzije inkompatibilne krvne grupe ili transplantacije organa.

Otkrićem ABO sustava krvnih grupa 1900. godine austrijski liječnik Karl Landsteiner utemeljio je transfuzijsko liječenje i 30 godina kasnije za svoj rad dobio Nobelovu nagradu. U isto vrijeme su do istog otkrića došli i Čeh Jan Janski (1907.) i Amerikanac William Moss (1910.). Tri glavne krvne grupe Landsteiner je objasnio postojanjem dva antigena A i B na eritrocitima, te protutijelima anti-A i anti-B u serumu. Četvrtu i najrjeđu krvnu grupu AB, kasnije su opisali Decastello & Sturli. Osnove nasljeđivanja ovog sustava otkrili su 1910. godine Ludwik Hirszfeld i Erich von Dungem, a nešto kasnije Felix Bernstein dokazuje postojanje više alela na jednom lokusu. Englezi Watkins i Morgan krajem sedamdesetih godina definiraju specifične ugljikohidrate i to N-acetilgalaktozamin za A i galaktozu za B krvnu grupu (Watkins 2001).

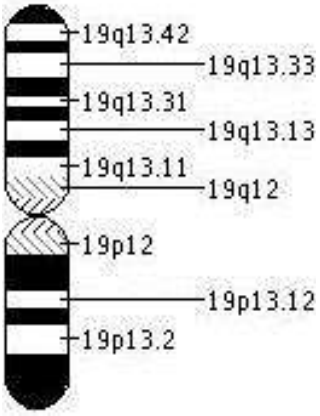
Otkriveni su brojni eritrocitni antigeni svrstani u trideset sustava krvnih grupa. Radom Yamamota 1990. klonirani su ABO geni, što je omogućilo naprednije strukturne i funkcionalne analize ABO sustava (Yamamoto 1995). Uslijedile su brojne studije polimorfizma ABO gena kojima se bavi molekularna biologija, oligosaharidnih A i B antigena, što je područje interesa glikobiologije, a čiji se rezultati uspješno primjenjuju u forenzici, transfuzijskoj medicini, transplantaciji stanica, tkiva i organa, staničnoj i razvojnoj biologiji. Enzimologija vrši ispitivanja A i B glikoziltransferaza, a imunologija proučava produkte antigena tj. stvaranje, pojavnost, učinkovitost i uloge anti-A i anti-B protutijela, kao i mogući gubitak A/B antigene ekspresije uz pojavu nekih tumorskih oboljenja (Mohandas et al. 2005).

1.2. Eritrocitne krvne grupe

Od ukupnog broja otkrivenih eritrocitnih antigena, 300 ih je svrstano u 30 sustava krvnih grupa. Sustav krvne grupe je definiran kao skup antigena čiji se geni nalaze na jednom genskom mjestu (lokusu) ili se radi o vrlo blizu smještenim homolognim genima. Primjer prvog sustava je ABO sustav u kojem se na jednom genskom mjestu nalazi gen za antigen A, B ili O, a drugog Rh sustav u kojem antigene kontroliraju dva vrlo blizu smještena gena RHD i RHCE. Eritrocitni antigeni su proteini ili ugljikohidrati vezani za glikoproteine i glikolipide stanične membrane. Proteinski antigeni su antigeni Rh, Kell, Kidd i Duffy sustava i njihova sinteza određena je izravno odgovarajućim genima. Antigeni ABO, Lewis i P sustava krvnih grupa su ugljikohidratni i u njihovom nastajanju geni kontroliraju sintezu enzima glikoziltransferaze koja katalizira sintezu antigena (Daniels 1995).

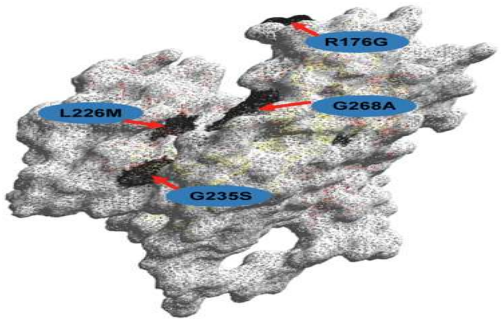
Antigene ABO sustava određuju šećeri na glikoproteinima i glikolipidima eritrocitne membrane. ABO geni kontroliraju enzime transferaze koje dodaju šećere na H-antigen, bazičnu supstanciju s fukozom. Geni za A i B antigene su kodominantni, što znači da svaki gen određuje antigen neovisno o genu koji se nalazi na drugom alelu. Gen O je funkcionalno neaktivan pa je „recesivan“. U njemu najčešće postoji delecija jednog nukleotida što uzrokuje prijevremenu šifru za završetak čitanja (tzv. stop kodon) i zbog toga nastaje neaktivna transferaza.

Geni koji reguliraju sintezu eritrocitnih antigena uglavnom se nasljeđuje prema Mendelovim zakonima i većinom su kodominantni tj. na eritrocitima se iskazuju antigeni naslijeđeni od oba roditelja. Recesivni se geni fenotipski ne iskazuju u prisutnosti dominantnih gena. Tako, kada postoji „normalni“ A gen, slabije inačice A-antigena kao što je npr. A_2 se ne iskazuju. Postoje i amorfni geni koji se ni u homozigotnoj formi ne iskazuju sintezom antigena. Primjer za to je krvna grupa O u kojoj su oba gena na ABO lokusu promijenjena tako da nema sinteze aktivne glikoziltransferaze. Osobe koje nasljeđuju amorfne gene su tzv. null fenotipovi i oni su bez ijednog antigena određenog sustava krvnih grupa. Odsutnost antigena na eritrocitnoj membrani može se očitovati morfološkim promjenama eritrocita i čak znakovima blage anemije. Osim strukturnih gena, eritrocitne antigene kontroliraju i regulatorni geni (Kominato et al. 2005).



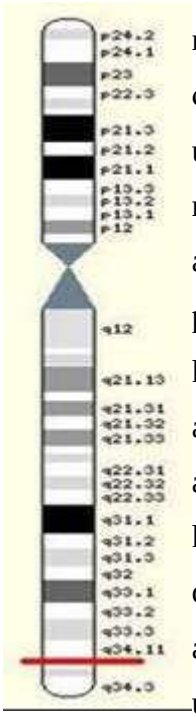
Esencijalni prekursor antigena ABO sustava krvnih grupa je H antigen. H lokus (FUT1) smješten je na 19 kromosomu (19p13.12, Slika 1.1.) Sadrži 3 eksona koji obuhvaćaju 5 kb genomske DNA i kodira fukoziltransferazu (Slika 1.2.) koja katalizira sintezu H antigena na eritrocitima. Inaktivni *h* aleli rezultiraju fenotipom O*h* (Bombay).

Slika 1.1. Shema 19. kromosoma (Preuzeto iz: ghr.nlm.nih.gov)



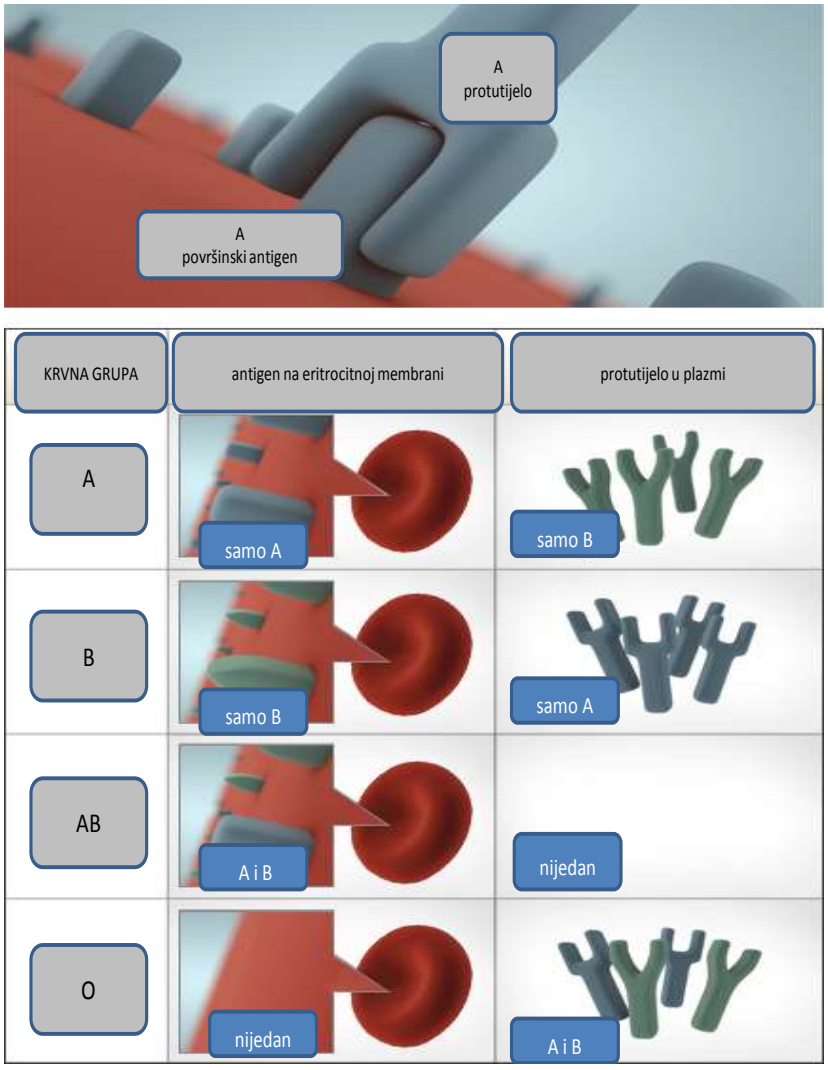
Slika 1.2. Strukturni prikaz glikoziltransferaze (Preuzeto iz: Blood 2009,114)

Humani ABO gen je smješten na kromosomu 9 (9q34.1-q34.2, Slika 1.3.) Sadrži 7 eksona i 6 introna koji obuhvaćaju 18 kb genomske DNA. ABO tip krvne grupe je pod nadzorom jednog gena s tri alela: i, I^A i I^B. Zadnja dva eksona (6 i 7), kodiraju domenu ABO glikoziltransferaze, enzima koji modificira sadržaj ugljikohidratog antigena na eritrocitima i tako određuje tip. A i B aleli se razlikuju po 7 nukleotidnih zamjena, 4 od njih dovode do supstitucija različitih aminokiselina u proteinima (R176G, G235S, L266M, G268A). Ostaci na pozicijama 266 i 268 određuju A ili B specifičnost glikoziltransferaze koju kodiraju. A alel kodira glikoziltransferazu koja dodaje α- N-acetilgalaktozamin na D-galaktozu na kraju H antigena stvarajući A antigen. B alel kodira glikoziltransferazu koja dodaje α-D-galaktozu na D-galaktozu na kraju H antigena, stvarajući B antigen. U slučaju O alela, ekson 6 sadrži deleciju koja rezultira gubitkom enzimske aktivnosti. O alel se razlikuje od alela A u deleciji samo jednog nukleotida - guanin na poziciji 261. Delecija uzrokuje nedostatak enzimske aktivnosti i H antigen ostaje nepromijenjen (Anstee DJ, 2009, Seltsam et al. 2003).



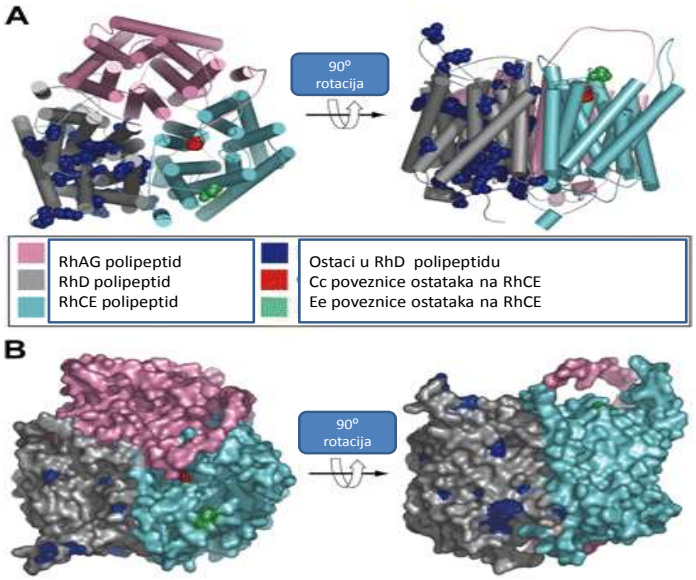
Slika 1.3. Shema 9. kromosoma (Preuzeto iz: ghr.nlm.nih.gov)

Antigeni na eritrocitima uvjetuju specifičnost protutijela u serumu, što je shematski prikazano na Slici 1.4.



Slika 1.4. Antigeni ABO krvnih grupa na eritrocitima i IgM protutijela u serumu (Preuzeto iz: en.wikipedia.org)

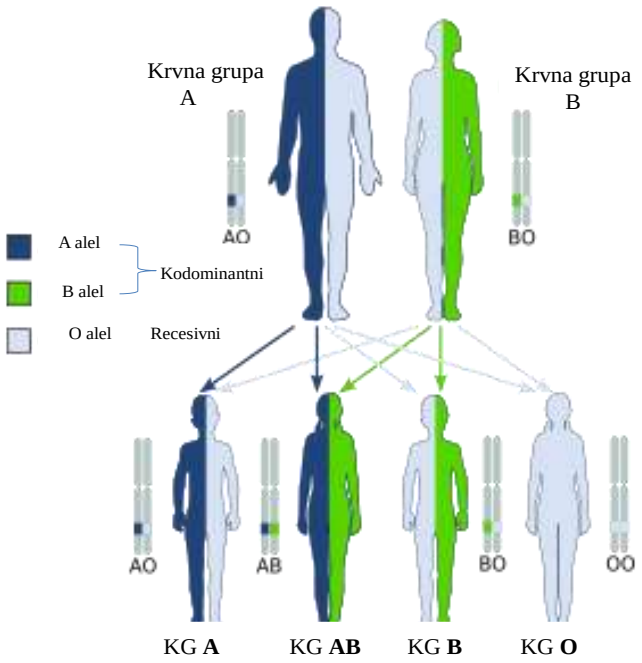
Rh sustav antigena je najsloženiji krvnogrupni sustav kojeg čini 50 antigena, a klinički najznačajniji je RhD antigen, zatim C, c, E i e. Na slici 1.5. je prikazan model strukture RhD antigena. Rh antigeni stvaraju se djelovanjem dvaju bliskih i visoko homolognih gena koji su smješteni na kratkom kraku prvog kromosoma. RhD gen kodira polipeptid s D antigenom i RhCE gen koji kodira polipeptid s C, c, E i e antigenima. Ta dva polipeptida se razlikuju u samo 36 aminokiselina (Daniels 2005, Burton et al. 2008).



Slika 1.5. Model strukture RhD antigena: A – Strukturni model Rh proteina koji se sastoji od RhAG (roza boja), RhD polipeptid (siva boja) i RhCE polipeptid (cijanidna boja). Ostaci u D polipeptidu prikazani su plavo, a crvene i zelene su poveznice Cc i Ee sa CE polipeptidom. B - hipotetski heterotrimer (roza-RhAG, sivo-RhD, cijanidno RhCE) (Preuzeto iz: Curr Opin Hematol 2008).

1.3. Nasljeđivanje ABO sustava krvnih grupa

Krvne grupe se nasljeđuju od oba roditelja, što je shematski prikazano na slici 1.6. Sustav ABO krvnih grupa je pod kontrolom jednog gena sa 3 alela: *i*, I^A *i* I^B. Alel I^A određuje grupu A, alel I^B određuje grupu B, a alel *i* rezultirati će O krvnom grupom. Kako su I^A i I^B dominantni nad *i* alelom, samo će osobe koje naslijede *ii* od roditelja imati O krvnu grupu. Osobe koje imaju kombinaciju I^AI^A ili I^Ai imaju krvnu grupu A. Osobe koje naslijede od roditelja I^BI^B ili I^Bi nositelji su krvne grupe B. Osobe sa genotipom I^AI^B imaju oba fenotipa, jer i A i B pokazuju kodominaciju, što znači da roditelji krvne grupe A i krvne grupe B mogu imati dijete krvne grupe AB. Međutim, isti roditelji mogu imati i dijete krvne grupe O, ukoliko su oboje heterozigoti *(*I^Bi, I^A *i). Cis-AB* fenotip ima jedan enzim koji stvara oba antigena, i A i B antigen. Kao posljedica toga dolazi do slabe ekspresije A ili B antigena, odnosno ekspresija nije na očekivanoj razini kao kod osoba sa „normalnom“ A_1 ili B krvnom grupom (Calafell et al. 2008).



Slika 1.6. Shematski prikaz nasljeđivanja ABO krvnih grupa (Preuzeto iz: ghr.nlm.nih.gov (U.S. National Library of Medicine)

Sve kombinacije u nasljeđivanju sustava ABO krvnih grupa prikazane su u Tablici 1.1.

Tablica 1.1. Moguće kombinacije u nasljeđivanju ABO krvnih grupa

Nasljeđivanje ABO KG					
Majka	**Otac**	**O**	**A**	**B**	**AB**
O		O	O, A	O, B	A, B
A		O, A	O, A	O, A, B, AB	A, B, AB
B		O, B	O, A, B, AB	O, B	A, B, AB
AB		A, B	A, B, AB	A, B, AB	A, B, AB

Serološkim metodama moguće je odrediti šest fenotipova: A, B, A2, A2B, AB i O, pomoću anti-A i anti-B antiseruma. Metodama molekularne biologije omogućena je ABO genotipizacija. PCR-SSP metodom koja se temelji na nemogućnosti Taq polimeraze da popravi neslaganje na 3' kraju DNA ishodnice, moguće je razlikovati O^1, O^2, A^1, A^2 i B alele, tj. 15 različitih ABO genotipova (Issitt et al 1998).

Uz osnovne alele, subtipizacijom je definirano puno rijetkih alela (181 ABO alela, prema podacima preuzetim iz Blood group antigen mutation database (BGMUT 2012). Nomenklatura subtipova je definirana prema A1O1 alelu, koji je izabran kao standardni. Aleli se razlikuju po samo nekoliko baza u kodirajućoj sekvenci ili u nekodirajućoj regiji gena, a polimorfizmi su nastali kao posljedica SNP-(single nucleotyde polimorphism) ili intragenske rekombinacije uslijed konverzije gena (crossing over). Praktično, u imunohematološkom laboratoriju, subtipovi pokazuju razlike u jačini aglutinacije eritrocita s anti-A, anti-B i anti-A,B reagensima.

1.4. Raspodjela ABO sustava i evolucijski pokazatelji

Raspodjela krvnih grupa A, B, O i AB varira diljem svijeta po populacijama, a mogu se pratiti i varijacije unutar subpopulacija (Garratty et al. 2004).

Primjerice, u Velikoj Britaniji, distribucija krvnih grupa stanovništva pokazuje neke korelacije sa invazijama i migracijama stanovništva, uključujući Vikinge, Dance, Sase, Kelte i Normane (Potts et al. 1979).

Postoji šest zajedničkih alela u bijeloj rasi vezano uz ABO sustav krvnih grupa (Seltsam et al. 2003):

A	**B**	**O**
▪ *A1O1*(A1)	▪ *B1O1*(B1)	▪ *OO1*(O1)
▪ *A2O1*(A2)		▪ *OO2*(O1v)
		▪ *OO3*(O2)

Mnoge rijetke varijante ovih alela pronađene su u ljudskoj populaciji diljem svijeta.

Neki evolucijski biolozi tvrde da se najranije razvio alel I^A, a zatim O (delecijom jednog nukleotida), te posljednji I^B. To je u skladu s prihvaćenim obrascima ranog kretanja stanovništva, a rezultat toga je prevladavanje nekih krvnih grupa u pojedinim zemljopisnim područjima, npr., B krvna grupa je više zastupljena među stanovništvom azijskog kontinenta,

dok je u zapadnoeuropskim zemljama relativno rijetka. Druge teorije tvrde da postoje četiri glavne linije nasljeđivanja ABO gena i da su se mutacije koje su stvorile O krvnu grupu dogodile najmanje tri puta u ljudskoj evoluciji. Oprečna ovima je ranija teorija prema kojoj je O krvna grupa najstarija (Klein 2007).

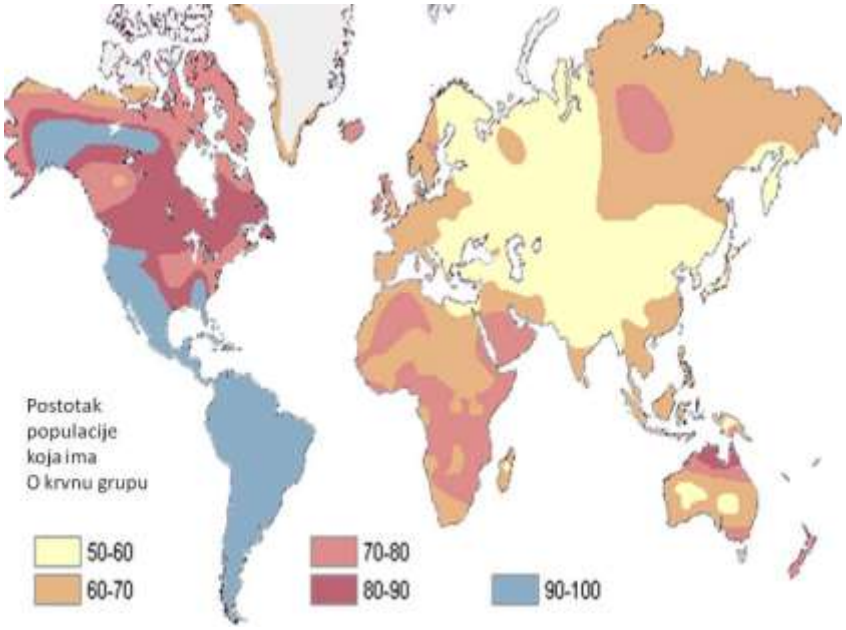
Prevalencija pojedinih alela u populacijama je različita i postoje razlike prema etničkim skupinama. U Sjedinjenim Američkim državama je A1 alel dvostrukom češći kod bijelaca u odnosu na crnu rasu. A2 je skoro izjednačeno zastupljen među bijelcima i crncima, a vrlo rijetko kod pripadnika orijentalnih naroda (Tablica 1.2.).

Tablica 1.2. Prevalencija pojedinih alela među različitim rasama u SAD

Alel	Protein	% u SAD		
		bijelci	crnci	orijentalci
A1	A1 transferaza	22	12	18
A2	A2 transferaza	7	6	Rijetko
B	B transferaza	6	12	17
O	nefunkcionalno	65	70	65

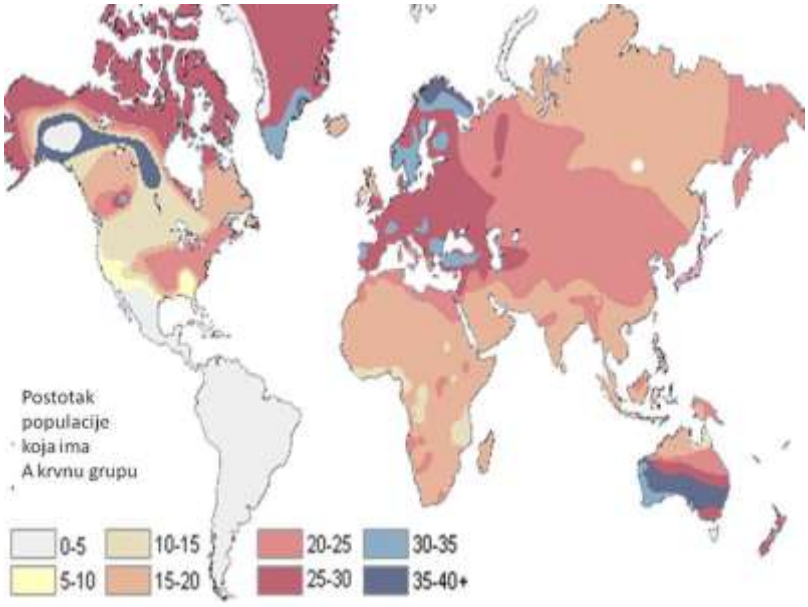
Preuzeto iz: NCBI Blood Group Antigen Gene Mutation Database

U svijetu je najviše nositelja O krvne grupe, ukupno preko 50%. Najviše stanovnika koji nemaju A i B alele potječu iz Srednje i Južne Amerike, slijede stanovnici Sjeverne Amerike i afričkog kontinenta, te dio stanovništva u Zapadnoj Europi. Krvna grupa O je najmanje zastupljena u istočnoj Europi (Slika 1.7.).

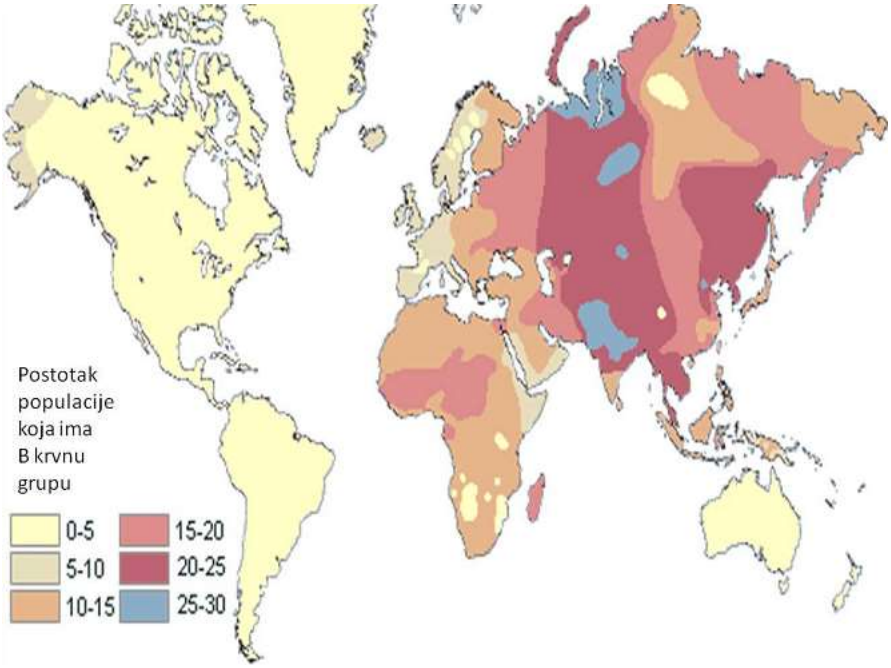


Slika 1.7. Raspodjela nositelja O krvne grupe u svijetu (Preuzeto iz: anthro.palomar.edu)

Uspoređujući A i B alele, vidljiva je puno veća zastupljenost A alela. U svijetu je oko 21% nositelja A alela, najviše među sjevernoameričkim Indijancima, australskim Aboridžanima, te stanovnicima skandinavskih zemalja (Slika 1.8.) Zastupljenost B alela u svijetu je puno manja, samo oko 16 % (Slika 1.9.). Na američkim kontinentima i Australiji je izrazito mali postotak nositelja B alela, dok su na azijskom kontinentu skoro četvrtina stanovništva nositelji B alela (Bloodbook.com. 2010).



Slika 1.8. Raspodjela A alela u svijetu (Preuzeto iz: anthro.palomar.edu)



Slika 1.9. Raspodjela B alela u svijetu (Preuzeto iz: anthro.palomar.edu)

1.5. ABO sustav krvnih grupa i bolesti

Nedvojbena je povezanost nastanka protutijela na ABO krvne grupe sa pojedinim bolestima i komplikacijama, kao što su protutijela koja uzrokuju hemolitičke transfuzijske reakcije, hemolitičku bolest novorođenčeta, autoimune hemolitičke anemije, odbacivanje presatka.

Prevalencija pojedinih ABO alela u populacijama je različita, postoje i mnoga istraživanja koja potvrđuju povezanost pojavnosti nekih bolesti sa različitim genotipovima ABO krvnih grupa. Najčešće se navode kardiovaskularne, gastroduodenalne, tumorske bolesti i infekcije (Nayak 1997).

Mnogi znanstvenici ispituju povezanost ABO sustava krvnih grupa kao genetičkog čimbenika, s različitim bolestima. Tako npr. rezultati istraživanja povezanosti tromboza s ABO sustavom variraju, u nekim populacijama veći rizik za trombotičke događaje nosi alel A, u nekima alel B i diplotip AB. Genetički trombotički faktori kao što su mutacije FV Leiden, protrombin G20210A i MTHFR C677T još dodatno povećavaju taj rizik (Garraty G, 2005).

1.5.1. ABO sustav krvnih grupa i infekcije

Postoje dokazi o vezi ABO sustava i infektivnih bolesti, te sklonosti pojedinih bakterija, virusa i parazita za vezanje na eritrocite s određenim antigenima krvnih grupa, koji djeluju kao receptori. Primjer za to je da su nositelji O krvne grupe relativno rezistentni na teški oblik malarije (Cserti et al. 2007). Pretpostavlja se da su glavne razlike u građi ABO sustava krvnih grupa, s obzirom na oligosaharidne komponente, u različitim dijelovima svijeta bile uzrok izazivanju epidemija infektivnih bolesti u prošlosti (Blackwell et al. 2002).

1.5.2. ABO sustav krvnih grupa i tumorske bolesti

Veliki broj ispitivanja usmjeren je na povezanost ABO sustava krvnih grupa i pojavnosti malignih oboljenja. Tako je utvrđena češća pojava karcinoma kod osoba krvnih grupa A ili AB uz obrazloženje da tumorski biljezi imaju značajke nalik na antigen A, pa ih teško otkrivaju imuni sustavi krvnih grupa A i AB. Dokazano je da kod određenih vrsta karcinoma, posebice probavnog trakta, krvna grupa A ima više razine tumorskog supresorskog gena p53. Visoka razina tog gena upozorava da je tumor postao invazivniji te je počeo narušavati proizvodnju antigena krvne grupe (Iodice et al. 2010).

Autoimune bolesti u kojima je pojačan nadzor i prekomjerno aktivan imuni sustav, pri čemu se rjeđe razvijaju zloćudne bolesti, više se povezuju s krvnom grupom O. Ipak, postoji nekoliko vrsta tumora koji se povezuju s krvnim grupama O (melanom) i B (karcinom kosti i mokraćnog mjehura). Te spoznaje povezuju maligna oboljenja s poremećajem aktivnosti krvne grupe, a ekspresija antigena nalik na krvnu grupu A na površini tumorskih stanica najčešći je od ovih poremećaja (Metoki et al.1989).

Rizik od malignog oboljenja dodatno može biti povećan, ovisno o sekretorskom statusu osobe. Sekretori, čiji antigeni slobodno cirkuliraju tijelom, općenito su izloženi većem riziku od nesekretora (Jaff MS, 2010).

Istraživanjem karcinoma dojke znanstvenici su došli do zaključka da je krvna grupa važan prognostički čimbenik glede sklonosti pojave i ishodu liječenja i to kao genetski čimbenik jer se gen za koji se pretpostavlja da je povezan s karcinomom dojke nalazi blizu gena za krvnu

grupu na kromosomu 9. Žene s krvnom grupom A općenito češće doživljavaju lošiji ishod i sklonije su bržem razvoju i širenju ove vrste karcinoma. Žene s krvnom grupom AB bliže su krvnoj grupi A i imaju neznatno pojačanu sklonost i vjerojatnost ponovnog obolijevanja, te kraće vrijeme preživljavanja. Među oboljelim ženama, rjeđe su one s krvnom grupom O, kod kojih je uočeno da imaju bolje rezultate liječenja i rjeđu smrtnost. Ovaj se karcinom rjeđe javlja i kod žena krvne grupe B, osim onih sa obiteljski opterećenim rizikom (Costantini et al. 1990).

Ginekološki tumori su češći i povezuju se s lošijim prognozama kod žena s krvnom grupom A, kao karcinom endometrija, grlića maternice i jajnika. Žene nositeljice B krvne grupe su najmanje sklone zloćudnom tumoru jajnika (Marinaccio et al. 1995).

Karcinom mokraćnog mjehura češći je kod osoba krvnih grupa A, AB i B, nesekretora. Povezanost s krvnom grupom A objašnjava se istraživanjem koje je pokazalo da su stanice tumora mokraćnog mjehura strukturalno slične antigenu A. Kod osoba krvne grupe B ta povezanost uključuje njihovu sklonost prema mokraćnim i bubrežnim infekcijama. Budući da krvna grupa AB dijeli sklonost krvnih grupa A i B prema pobolijevanju, rizik za ovaj oblik karcinoma je još veći (Orlow et al. 1998).

Zbog velike povezanosti karcinoma pluća i pušenja, bilo bi za pretpostaviti da taj snažan rizični čimbenik nadjača sve razlike između krvnih grupa, no ipak više ljudi s krvnom grupom A oboli od karcinoma pluća, a manje je oboljelih s krvnom grupom O (Ulger et al. 2002).

Izrazita veza otkrivena je između osoba krvne grupe A te tumora mozga i živčanog sustava, a puno rjeđa kod osoba s krvnom grupom B. Znanstvenici koji su proučavali djelovanje postoperativne boli i imunokemoterapije na tumore mozga, otkrili su da je intervencija bila djelotvorna kod krvnih grupa A i AB, ali ne i za krvnu grupu O (za krvnu grupu B ne postoje podaci). Na temelju dobivenih rezultata, zaključili su da bi odabir kemo i imunokemoterapije trebao biti prema krvnoj grupi. Iako je riječ o izoliranom otkriću, ono pokazuje mogućnost da medicinska intervencija u slučaju karcinoma, a možda i u slučaju drugih bolesti, može biti učinkovitija ako se krvna grupa razmatra i kao čimbenik liječenja (Mehrazin 2006).

Dosad je provedeno nekoliko istraživanja karcinoma kože i krvne grupe. Općenito, čini se da je karcinom kože izrazito povezan s krvnom grupom O. Uz najveću učestalost pojave melanoma, kod osoba krvne grupe O navodi se i najkraća prosječna stopa preživljavanja

nakon postavljanja dijagnoze. Krvna grupa A imala je najdužu stopu preživljavanja (Tursen et al. 2005).

Karcinom kostiju se najviše povezuje s krvnom grupom B, a najmanje s krvnom grupom A. Najsnažnije predispozicije za leukemiju imaju osobe krvne grupe A, a najmanje osobe krvne grupe O, pogotovo žene. Epstein-Barrov virus utječe na razvoj bolesti pa su osobe s krvnom grupom B, sklonijoj infekcijama, izložene nešto većem riziku (Janardhana et al. 1991).

1.5.3. Antigeni krvnih grupa u malignim bolestima

Epidemiolozi ističu da ekologija i način življenja uzrokuju čak i do 90 % oboljenja od malignih bolesti, što daje i nadu za liječenje. Istraživanja i otkrića u molekularnoj biologiji na virusima koji uzrokuju karcinome (onkovirusima) i istraživanja na mehanizmima obnove DNA pružaju sve veće mogućnosti liječenja najteže bolesti. Krvna grupa je detektirana kao važan čimbenik u procjeni rizika razvoja maligne bolesti, kao i na procjenu stope preživljavanja oboljelih. To objašnjava činjenicu da je gen koji određuje krvnu grupu jedan od najjačih gena u tijelu i najjača podrška imunološkom sustavu. Zadatak imunološkog sustava je upravo zaštita organizma od stranih uzročnika, pa tako i od karcinogenih tvari sofisticiranim metodama. Jedna metoda uključuje traženje kemijskih biljega koji se nazivaju antigenima i koji se nalaze na stanicama našeg organizma. Antigen može biti svaka tvar na koju će imunološki sustav reagirati na odgovarajući način i moći razlučiti radi li se o vlastitom ili stranom. Među mnogim antigenima u tijelu nalazi se i onaj koji određuje krvnu grupu. Imunološki sustav svaku sumnjivu tvar ili mikroorganizam uspoređuje sa antigenom svoje krvne grupe. Protiv stranih antigena sustav stvara antitijela i to je uobičajena zaštita organizma (Reid et al. 2004).

Antigeni krvnih grupa usko su povezani s procesom diferencijacije stanica. Proizvodnja antigena regulira se u stanicama krvnih žila fetalnih organa i vjeruje se da određuju smještaj budućih krvnih žila u organima koji se razvijaju. Antigeni krvnih grupa tu djeluju kao biljezi diferencijacije stanica. S obzirom da se stanice tumora uglavnom ponašaju kao embrionalne stanice u fetalnim organima, ova važna embrionalna funkcija najvjerojatnije je najvažniji razlog zašto antigeni krvnih grupa nastaju i nestaju u tkivima prije nego postanu agresivno zloćudni i metastaziraju. Pošto su antigeni krvne grupe potrebni za diferencijaciju stanica,

njihov gubitak može potaknuti razvoj tumorskih stanica koje tada dobiju sposobnost cirkuliranja tijelom. Kod zloćudnih stanja gubitak krvne grupe znači migraciju nenadzirane vrste stanica (nediferenciranih) – metastazu. Kod tkiva i organa koji normalno ne proizvode antigene krvnih grupa, kada postanu kancerogeni, razviti će antigene krvne grupe. Kod karcinoma štitne žlijezde i debelog crijeva, promjene koje nastaju u ekspresiji antigena krvne grupe u jednom organu, utjecat će na ekspresiju antigena krvne grupe u drugom organu (Wolpin et al. 2009).

Mnoge maligne stanice (npr. kod karcinoma dojke i želuca) razvijaju tumorski biljeg po imenu antigen Thomsen-Friedenreich (antigen T i antigen Tn-slabije razvijen antigen) koji po strukturi sliči antigenu A. Kod normalnih stanica antigen je potisnut, ali kada stanice postaju maligne, on se budi. Ako je karcinom dobro diferenciran, antigeni T su dominantni, a manje je antigena Tn. Kod slabo diferenciranih tumorskih stanica dominira Tn. Svaki čovjek ima u organizmu, stvarajući ih primarno u crijevnoj flori, antitijela na antigen T i Tn. Krvne grupe A i AB pokazuju najmanje agresivnu reakciju na ta dva antigena upravo zbog njihove sličnosti u strukturi s antigenom A, pa su stoga i najviše sklone malignim bolestima. Ta je hipoteza snažna i dobro dokumentirana (Guleria et al. 2005; Maisonneuve et al. 2009).

Postoje rijetki slučajevi u kojima se krvna grupa promijenila iz jedne u drugu, što predstavlja krajnost u borbi protiv karcinoma. Organizam se u tom slučaju pokušava distancirati od tumorskih stanica preuzimanjem druge krvne grupe. Svi zabilježeni slučajevi gdje se krvna grupa tijekom maligniteta promijenila, uključivali su preuzimanje antigena sličnog krvnoj grupi B u bolesnika koji je imao krvnu grupu A (Hakomori S. 1999). Primjećeno je i da bolesnici s malignom bolešću koji su transfuzijski liječeni imaju sporiji oporavak od onih koji nisu primili transfuziju, jer dolazi do narušavanja imuniteta u momentima dok se krvna grupa primatelja privikava na neznatne razlike u dobivenoj krvi (Edgren et al. 2007).

1.5.4. ABO sustav krvnih grupa i čimbenici VIII i Von Willebrand

Još jedna biološka značajka krvne grupe A koja podupire veću sklonost ka malignim bolestima je njezina veća sklonost ka zgrušavanju. Kada počnu metastazirati, stanice karcinoma se često prenesu na cirkulirajućim trombocitima uz Faktor VIII i Von Willebrand Faktor (vWF). Ta dva čimbenika su bjelančevine u krvnom serumu koji se ponašaju kao

određena vrsta molekularnog ljepila. Trombociti ih koriste kako bi se vezali za bjelančevine odgovorne za zgrušavanje krvi koje su smještene duž stijenki krvnih žila. Glikoproteini devijantnih trombocita trebaju te čimbenike kako bi se vezali za stanice tumora. U uzorcima krvi bolesnika s metastazama dokazane su povišene razine Faktora VIII i vWF (gotovo dvostruko) u odnosu na zdrave osobe. Fiziološki krvne grupe A i AB imaju prirodno povišenu razinu tih čimbenika, kao i povišenu razinu fibrinogena – bjelančevine važne za zgrušavanje krvi, za upalne reakcije i zarastanja rana. Razina fibrinogena je također povišena kod osoba s malignitetom. Istraživanja su pokazala da su metastaze rjeđe kod bolesnika koji su uzimali antikoagulantnu terapiju (Jenkins et al. 2006; Franchini et al. 2012).

1.5.5. Antigeni krvnih grupa i čimbenici rasta

Postoji veza i između faktora rasta i onkogena – gena u stanici tumora koji stanicu transformiraju u stanicu tumora. Njihov učinak povezan je s čimbenicima rasta ili receptorima čimbenika rasta. Prekomjerna proizvodnja čimbenika rasta (kao rezultat djelovanja onkogena) dovodi do gubitka sposobnosti regulacije rasta. Antigen A ima sposobnost vezanja za receptore nekih epidermalnih čimbenika rasta (EGF - epidermal growth factor). EGF se prirodno sintetizira u tijelu kako bi se pojačala sposobnost tkiva da se samo obnavlja. Mnoge vrste tumora dovode do previsoke koncentracije receptora EGF koji se nađu na površini stanice. Veći broj receptora EGF znači da stanica tumora može vezati prekomjerni višak molekula EGF, što je od presudne važnosti za rast tumora. Danas je jasno da je rast raka dojke reguliran receptorima čimbenika rasta i zbog njegove deregulacije kemoterapijom se djeluje na EGF-R. Upravo antigeni krvne grupe A zbog sličnosti u ugljikohidratnoj strukturi imaju sposobnost vezivanja na suvišne EGF receptore, što će potaći nekontrolirani rast stanica (Costantini et al. 1990, Mehrazin 2006, Brian et al. 2009).

1.5.6. ABO sustav krvnih grupa i gastroduodenalne bolesti

Istraživanja vezana uz povezanost pojavnosti karcinoma želuca i ABO sustava krvnih grupa ukazuju da su nositelji krvne grupe A i AB izloženi većem riziku, te da je stopa preživljavanja kod njih manja, dok krvna grupa O ima zaštitni učinak tako što sprječava rast i

širenje tumora i omogućava duže preživljavanje. Rizik kod krvne grupe B sličan je onomu krvne grupe O. Veza između karcinoma želuca i antigena A povezana je s antigenom T, tumorskim biljegom ovog karcinoma koji se nalazi u stanicama karcinoma i koji nalikuje na antigen A. Zato i izostaje poticanje snažne reakcije protutijela na T antigen. Gotovo trećina Japanaca ima antigen T u zdravom tkivu želuca, što objašnjava visoku stopu ovog karcinoma u Japanu (Edgren et al. 2010).

Kod karcinoma gušterače bilježi se značajna povezanost bolesti s ABO sustavom krvnih grupa. Povećan rizik dokazan je kod osoba krvnih grupa A, B i AB, dok je kod krvne grupe O zabilježena određena zaštita. Antigene strukture krvne grupe prevladavaju na stanicama karcinoma gušterače i imaju sposobnost mijenjanja. Kod ovog karcinoma moguća je proizvodnja neodgovarajućih krvno grupnih antigena. U svim objavljenim slučajevima to se očitovalo ekspresijom antigena B na karcinomu gušterače u osoba s krvnom grupom A (Hakomori S, 1999; Maisonneuve et al. 2009; Wolpin et al. 2009**;** Brian et al. 2010).
Karcinom jetre češće je povezan s krvnom grupom A, dok je za karcinom žučnog mjehura, koji se primarno javlja kod starijih osoba, poznata statistička povezanost s krvnom grupom B. To se može povezati s osjetljivošću krvne grupe B na infekcije uzrokovane spororastućim virusima i bakterijama (Okada et al. 1987; Li et al. 2012).

Razvoj karcinoma debelog crijeva najčešće se mjeri razinom tumorskog biljega po imenu karcinoembriogeni antigen (CEA), koji je sličan antigenu A. Zloćudne stanice karcinoma debelog crijeva također pokazuju nesuzbijeni antigen T koji je sličan krvnoj grupi A. Za karcinome debelog crijeva karakteristično je pojavljivanje i nestajanje antigena krvne grupe. Često je promijenjeni antigen krvne grupe, zapravo zaštitni znak zloćudnosti ove vrste karcinoma. U poodmaklim stadijima mogu se javiti antigeni koji nisu kompatibilni s krvnom grupom osobe (Makoto et al. 2011).

1.5.7. ABO sustav krvnih grupa i kardiovaskularne bolesti

Povezanost između ABO krvnih grupa i bolesti koje rezultiraju pomakom koagulacijske ravnoteže ka stvaranju tromba dokazana je u mnogim ispitivanjima (Wu et al. 2008). To je potvrđeno brojnim studijama venskih tromboza kod nositelja ne-O krvnih grupa koji posjeduju veću razinu von Willebrand faktora, što posreduje pojačanu adheziju i

agregaciju trombocita (Franchini et al. 2007). Rezultati ispitivanja pojave koronarno arterijske bolesti i infarkta miokarda, dali su međutim oprečne rezultate u različitim studijama, iako sa fiziološkog stajališta postoji opravdana povezanost ovih procesa s ABO sustavima, jer se ugljikohidratni eritrocitni antigeni nalaze i na trombocitima i endotelu krvnih žila (Carpeggiani et al. 2010). Rezultati studije Clarka i Wu objavljeni u ožujku 2011. godine upućuju na vrlo mali utjecaj ABO krvnih grupa na rizik razvoja infarkta miokarda (Clark et al. 2011). U odnosu na višestruko potvrđenu povezanost ABO krvnih grupa sa venskim trombozama, većina studija povezanosti ABO sa arterijskim bolestima nije dala konzistentne rezultate (Clark, Wu). To je identično sa istraživanjem Cesene i suradnika provedenim na 541 bolesniku koje je pokazalo veću sklonost razvoju prijevremene koronarne bolesti kod osoba krvne grupe A (Cesena et al. 2006; Akhund et al. 2001). Rezultati skupine autora iz 2004. godine govore u prilog zaštitnoj ulozi O krvne grupe u procjeni rizika za razvoj infarkta miokarda (von Beckerath et al. 2004) dok potpuno oprečne zaključke imaju istraživači u Bangladešu (Biswas et al. 2008). Rezultati istraživanja provedenog u Turskoj pokazuju da ABO sustav krvnih grupa nije značajno povezan sa razvojem infarkta miokarda (Sari et al. 2008).

Potpuno drugačije rezultate dobili su autor i suradnici u Švicarskoj čiji rezultati ukazuju na 2.5 puta veću zastupljenost infarkta miokarda kod osoba s krvnom grupom B. Iako su promatrali i ostale čimbenike rizika (tjelesna težina, kolesterol, fibrinogen, vWF), zaključili su da B alel ABO sustava krvnih grupa predstavlja nezavisni čimbenik rizika za nastanak infarkta miokarda. Mehanizam utjecaja B alela na koronarni protok krvi nije razjašnjen (Nydgger et al. 2003).

Sva navedena istraživanja navode nas na zaključke o važnosti i ulozi krvnih grupa. One svojom vitalnom funkcijom štite organizam i pomažu mu u borbi protiv bolesti. Njihova distribucija u svijetu svjedoči i o postojanju većih epidemija u nekim područjima. Veliki postotak O krvne grupe (88%) među američkim Indijancima podržava tezu o otpornosti ove grupe na zarazu sifilisom. Istovremeno su osobe O krvne grupe bile najmanje otporne na epidemiju kolere, a najrjeđe su oboljevale od tuberkuloze. Nisu sklone malignim oboljenjima gušterače, želuca, dojke, jajnika i cerviksa. Rjeđe oboljevaju od kardiovaskularnih bolesti, ali su skloniji ulkusima. Imaju i veći rizik za oboljenje od malarije.

Osobe s krvnom grupom A uz povećani rizik za maligna oboljenja, posebno gastrointestinalnog trakta, češće razvijaju tromboembolijske bolesti. Ranije su bili otporniji na kugu, ali prijemčiviji za velike boginje. Sadašnja raspodjela krvne grupe B govori u prilog neotpornosti na kugu u srednjem vijeku, ali i prijemčivosti za virusne infekcije i po zadnjim istraživanjima provedenim u Švicarskoj imaju, uz povećane ostale rizične čimbenike, 2.5 puta veću prevalenciju infarkta miokarda od kontrolne skupine (Nydgger et al. 2003).

Neupitna je važna uloga ABO krvne grupe u našim životima. Svaka ima svoje prednosti i nedostatke i ne postoji idealna, bar sa stanovišta njihove povezanosti sa pojavnosti bolesti.

1.6. Tromboembolijske bolesti

Mehanizam zgrušavanja krvi sastoji se od niza kompleksnih sekvencijskih reakcija u kojima sudjeluju određeni plazmatski glikoproteini nazvani čimbenici zgrušavanja, a osnovna uloga mu je štititi organizam od krvarenja i gubitka krvi. Do aktivacije sustava zgrušavanja krvi dolazi uslijed oštećenja krvnih žila, a taj proces je u normalnim okolnostima spregnut mehanizmima koji sprečavaju zgrušavanje. Sustav koji sprečava zgrušavanje krvi u normalnim uvjetima čine: glatkoća endotela, sloj endotelnog glikokaliksa, trombomodulin, antitrombin, prostaciklin, protein-C čiji učinak može biti povećan djelovanjem proteina-S. Ugrušak koji je nastao oštećenjem krvnih žila uklanja se procesom fibrinolize, fiziološkim procesom uklanjanja neželjenih, netopljivih depozita fibrina enzimskim cijepanjem, pri čemu nastaju topivi fibrinski fragmenti (White 2003).

Tromboembolijske bolesti su bolesti cirkulacije koje označava stvaranje ugruška (tromba) u venama ili arterijama zbog povećane sklonosti zgrušavanju krvi. To je patološka pojava ugruška u nekoj krvnoj žili. Ako se dio ugruška otrgne i dospije na neko drugo mjesto, nastaje embolija. Tromboembolije nastaju zbog međusobnog djelovanja genetskih i stečenih čimbenika rizika kao što su: dob, spol, operativni zahvat, trauma, imobilizacija, postojanje antifosfolipidnih antitijela, hiperhomocisteinemija, povišena razina čimbenika koagulacije VIII, maligna bolest, estrogeni, trudnoća i babinje, pušenje, debljina, šećerna bolest, povišene masnoće u krvi (Lane et al. 2000; Anderson et al. 2003; Baglin et al. 2003).

1.6.1. Podjela tromboembolijskih bolesti

Tromboze se s obzirom na lokalizaciju dijele u dvije osnovne skupine bolesti: venski tromboembolizam (VTE) i arterijska okluzivna bolest s aterosklerozom. Prema kliničkoj podjeli u venske tromboze se ubrajaju duboka venska tromboza, plućna embolija, ponavljajuće venske tromboembolije i postrombotski sindrom. Venske tromboze nastaju zbog razmjerno sporog protoka krvi u venama, pa se pojedini čimbenici zgrušavanja mogu nagomilati i započeti proces zgrušavanja krvi. Odlučujući faktor u nastanku arterijske tromboze je oštećenje arterijskog endotela do čega može doći zbog aterosklerotskih promjena, djelovanja bakterijskih toksina, mehaničkog oštećenja zbog turbulentnog protoka krvi, o drugih čimbenika (Reiner et al. 2001; White 2003)**.**

Postoje dva tipa hiperkoagulacijskih stanja: primarni i sekundarni. Primarni su najčešće prirođeni i očituju se kao kvalitativni ili kvantitativni poremećaji čimbenika zgrušavanja ili proteina koji sudjeluju u procesu zgrušavanja krvi. U sekundarna hiperkoagulacijska stanja ubrajaju se različti klinički poremećaji koji povećavaju rizik za nastanak tromboembolija (Brækkan et al. 2010)**.**

1.6.2. Venske tromboze

Još je od Wirchova (1846. godina) poznato da na nastanak tromboze utječu čimbenici koji čine klasični trijas: oštećenje endotela stijenke, staza krvi, hiperkoagulabilnost i/ili pojačana viskoznost krvi uz vrtložasto gibanje krvi. Za nastanak tromboze nije dovoljan poremećaj samo jednog od ovih čimbenika jer je u većini slučajeva nastanak multifaktorijalan. Predilekcijsko mjesto nastanka tromba je venski zalistak gdje najčešće dolazi do oštećenja endotela. Venska tromboza nastaje zastojem tromba (krvnog ugruška) u veni. Mogu biti zahvaćene površinske vene što se naziva superficijalni tromboflebitis ili duboke vene pa se govori o dubokoj venskoj trombozi**.** Tromboza je uvijek praćena flebitisom (upala vene), pa se koriste termini i tromboza i tromboflebitis. Tromboza može nastati zbog

koagulacijskih poremećaja (poremećaji u zgrušavanju krvi) ili može ukazivati na još neotkrivenu zloćudnu bolest (Bezemer et al. 2007).

1.6.2.1. Duboka venska tromboza

Duboka venska tromboza (DVT) predstavlja veliki javnozdravstveni problem. Klinički simptomi duboke venske tromboze povezani su sa stupnjem opstrukcije venskog protoka te upalom stjenke krvne žile, ali nijedan fizikalni nalaz ili kombinacija simptoma i znakova nisu dovoljno pouzdani za postavljenje dijagnoze, jer duboka venska tromboza može biti i asimptomatska. Incidencija DVT je 80 slučajeva na 100 000 osoba godišnje. U Sjedinjenim Američkim Državama uzrok je 600 000 hospitalizacija i 200 000 smrti godišnje radi masivne plućne embolije, a prema njihovim podacima kod hospitaliziranih bolesnika incidencija DVT je znatno viša i varira između 20-70%. Omjer DVT kod muškaraca i žena je 1,2:1, a najčešće se javlja nakon 40 godine života (Silverstein et al. 1998).

Prema epidemiološkim studijama opći čimbenici rizika DVT su: starija dob, imobilizacija duža od 3 dana, trudnoća i postpartalno razdoblje, veći kirurški zahvat, te dugotrajno sjedenje sa spuštenim nogama tijekom putovanja (npr. let avionom - jet leg) dulje od 4 sata, koje predstavlja rizik i za zdrave osobe.

Specifični znakovi duboke venske tromboze su: jednostrana oteklina (edem), bolna osjetljivost potkoljenične muskulature na postero-anteriornu kompresiju, te blaga do umjerena bolnost na palpaciju duž trombozirane vene. Mogu postojati i opći simptomi kao osjećaj slabosti, malaksalosti, blago povišena temperatura, ali bez zimice i tresavice. Po svom intenzitetu kod svakog pojedinca simptomi se razlikuju, pa dijagnozu duboke venske tromboze nije moguće postaviti samo fizikalnim pregledom nego je potrebno potvrditi posebnim dijagnostičkim pretragama. Uz to kod 75% bolesnika s dubokom venskom trombozom anamnestički postoje neka od stanja ili bolesti kao što su: visoka životna dob, maligne bolesti, postraumatska stanja, kirurški zahvati, pretjerana tjelesna težina, dugotrajno uzimanje kontracepcijskih pilula, srčani infarkt, kronične hematološke bolesti. Uz postojanje simptoma i čimbenika rizika, relativno jednostavnom laboratorijskom pretragom određivanja D-dimera, može se brzo postaviti dijagnoza koju je potrebno potvrditi. Najtočnije

dijagnostičke metode za nepobitno utvrđivanje postojanje duboke venske tromboze su Duplex-ultrazvučna i kompjutorizirana kontrastna tomografija snimanja krvnih žila dubokog venskog sustava. Snimke dobivene tom metodom pokazuju postojanje krvnog ugruška unutar lumena krvne žile, a oko krvnog ugruška krvna struja ima smjer prema srcu (Baker et al. 1998).

Homanov znak (bol kod nagle dorzofleksije stopala pri umjereno flektiranoj nozi u koljenu) je pozitivan u manje od 50% slučajeva sa DVT te u više od 50% slučajeva bez DVT, stoga je vrlo nespecifičan. Kod masivne tromboze ileofemoralnih vena i njihovih ogranaka koža je edematozna, blijeda ili cijanotična, uz jaku bolnost i čestu pojavu petehija, a kasnije se proširi i proksimalno, zbog sve manjeg arterijskog dotoka, a na stopalu i prstima nastaje ishemična gangrena. Plućna embolija je prva manifestacija DVT u 10% slučajeva.

1.6. 3. Arterijska okluzivna bolest s aterosklerozom

Aterosklerotske promjene na stjenkama arterija mogu uzrokovati hemodinamske poremećaje i/ili predstavljati potencijalni izvor embolusa. Od kliničkog značaja je i veličina (hemodinamski značaj) ali i kvalitativne osobine koje određuju površinu i građu sklerotskih promjena. Posebnu značajnost predstavlja lokalizacija aterosklerotskih promjena zbog mogućih opasnosti u slučaju nastanka potpune okluzije arterije. Ateroskleroza je najčešći uzrok stvaranja karotidnog plaka koji predstavlja osnovu za nastanak kompletne okluzije. Karotidne stenoze su često znak generalizirane ateroskleroze, te su dobri pokazatelji budućih cerebrovaskularnih, koronarnih i drugih vaskularnih bolesti. Aterosklerotske promjene se počinju javljati već u mladosti i starenjem se povećavaju. Kod osoba starijih od 65 godina njihova učestalost je preko 60%, sa prevalencijom muškog spola 2:1. Mnogobrojni su čimbenici prepoznati kao rizici nastanka okluzivne bolesti, a posljedice mogu biti od asimptomatskih, bezazlenih do smrtonosnih (Ross et al. 1999; Cesena 2006).

1.6.3.1. Infarkt miokarda

Akutni infarkt miokarda nastaje zbog naglog smanjenja koronarnog protoka kao posljedice trombotičkog začepljenja koronarne arterije. U koronarnoj arteriji obično nastaje ruptura ili erozija aterosklerotičnog plaka uz nakupljanje trombocita i formiranje tromba koji potpuno začepi arteriju. Dio srčanog mišića koji opskrbljuje krvlju začepljena arterija ostaje bez kisika, zbog čega dolazi do smrti stanica miokarda i nastanka nekroze miokarda. Akutni infarkt miokarda spada u akutni koronarni sindrom (Thygesen et al. 2007).

Simptomi infarkta miokarda su: bol u prsima u trajanju dužem od 20 minuta koja se obično širi u lijevu ruku ili vrat, mučnina uz povraćanje, bol u gornjem dijelu trbuha, otežano disanje, znojenje ili gubitak svijesti. Uz ove simptome neki bolesnici mogu imati probadanje ili pritisak u prsima (Mallinson 2010).

Prema epidemiološkim ispitivanjima, infarkt miokarda je tri puta češći u pušača. Povećane razine kolesterola odnosno lipidnih supstanci u krvi povećavaju rizik od infarkta miokarda za 3,8 puta, hipertoničari od infarkta miokarda obolijevaju 4 do 8 puta češće, a koronarna bolest je 8 puta češća u dijabetičara. Uz hiperglikemiju, hipertenziju, hiperlipoproteinemiju, pretilost i pušenje kao izrazito značajne rizične čimbenike za nastanak infarkta, postoje i dodatni čimbenici rizika, kao što su tjelesni napor, stresna događanja, promjene vanjskog tlaka i temperatura. Nepromjenjivi čimbenici rizika su: starosna dob (muškarci stariji od 45 godina, žene starije od 55 godina), pozitivna obiteljska anamneza i preuranjena koronarna bolest u obitelji **(**Valensi et al. 2011; Steptoe et al. 2012**).**

1.7. Nasljedne trombofilije

Razvoj molekularne dijagnostike omogućio je specifičnije utvrđivanje uzroka, a time i razumijevanje nastanka tromboze i sigurniju dijagnostiku nasljednih poremećaja. Time se promijenio pristup i liječenje, a tako i poboljšana prognoza za bolesnike s trombotičkim poremećajima. Noviji dijagnostički koagulacijski testovi, osobito oni temeljeni na polimeraznoj lančanoj reakciji, u posljednjih 15-tak godina doprinijeli su otkrivanju većeg broja genetskih poremećaja vezanih uz veći rizik za razvoj tromboze kod odraslih.

Nasljedne trombofilije kao sklonost spontanom nastanku tromboze danas sve više zaokupljaju pozornost pedijatara zbog čestih upita roditelja o potrebama testiranja djece u slučaju postojanja tromboza i/ili trombofilija u obitelji (Celik et al. 2008).

Danas je poznato da su čimbenici rizika koji uzrokuju pojavu nasljedne trombofilije vezani uz mutacije gena koji kontroliraju koagulacijske procese u organizmu. Izdvojeno je oko 30 gena čije mutacije uzrokuju nasljedni poremećaj zgrušavanja krvi koji vodi u trombozu, i uzrokuje doživotno pojačanu sklonost zgrušavanju krvi - hiperkoagulabilnost **(**Poort et al. 1996**;** de Moerloos et al. 2007).

Dijagnosticiranje nasljedne trombofilije vezano je uz razvoj laboratorijske dijagnostike, odnosno laboratorijskih testova koji otkrivaju nasljedni manjak ili poremećaj u radu antikoagulacijskih inhibitora, antitrombina (AT), proteina C (PC), proteina S (PS) i APC rezistencije, kao i genotipizacije mutacija odgovornih za nastanak trombotičkih događaja. Laboratorijska ispitivanja za nasljednu trombofiliju indicirana su kod bolesnika koji imaju podatke o obiteljskoj sklonosti, odnosno opterećenu obiteljsku anamnezu, oboljelih od duboke venske tromboze donjih ekstremiteta, plućne embolije, upale površinskih vena (tromboflebitis), ponavljajućih idiopatskih tromboza (nepoznata uzroka), tromboze nakon neznatne provokacije, u slučaju rane dobi oboljelih, tj. prve tromboza prije 45. godine života, te u slučaju udružene arterijske i venske tromboze, tromboze udružene sa smrću fetusa, tromboze na neuobičajenim mjestima (npr. cerebralna venska tromboza) (Celik M 2008)**.**

Poznate su brojne varijante nasljednih trombofilija, prema čimbenicima koji ih uzrokuju. Rijetke nasljedne trombofilije uzrokovane su deficitom antitrombina, proteina C, proteina S, disfibrinogenemijom, koje obuhvaćaju manje od 1% trombofilija. Antitrombin je čimbenik hemostaze koji se proizvodi u jetri, a uloga mu je antikoagulantna – inhibira djelovanje aktiviranih čimbenika koagulacije od kojih najsnažnije trombin (FIIa), zatim FXa, FIXa, FXIa, FXIIa i FVIIa. Nedostatak antitrombina nasljeđuje se autosomalno dominantno, a incidencija je oko 0,2-0,4% u općoj populaciji. Homozigotni oblici su izuzetno rijetki i najčešće nisu spojivi sa životom jer novorođenče tijekom prvih sati nakon poroda ima masivne tromboze i u arterijskom i venskom sustavu. Heterozigotni oblici mogu biti od blagih do umjereno teških koji imaju i do 50 puta veći relativni rizik za razvoj venske tromboze.

Protein C je čimbenik hemostaze koji se proizvodi u jetri. Uloga mu je u inhibiciji aktiviranih čimbenika FVIIIa i FVa. Nedostatak proteina C nasljeđuje se autosomno dominantno i postoje dva oblika – rjeđi i teži – homozigotni oblik, te blaži do umjereni – heterozigotni oblik. Učestalost kod bijelaca je oko 0,2-0,5%.

Protein S je kofaktor proteina C u sustavu hemostaze. Nedostatak proteina S nasljeđuje se autosomno dominantno, i postoje dva oblika – rjeđi i teži – homozigotni oblik, te blaži do umjereni – heterozigotni oblik. Prevalencija kod bijelaca je 0,03-0,15% (Bertina et al. 2011).

Puno učestalije su trombofilije uzrokovane genetičkom čimbenicima kao što je faktor V Leiden (FV R506Q mutacija), protrombin (FII) G20210A mutacija, i C677T mutacija enzima metilentetrahidrofolat reduktaze (Lane et al. 1996) . Ostali poznati nasljedni oblici poremećaja koji pridonose razvoju tromboembolija su povišena koncentracija čimbenika koagulacije: FVII, FVIII, FIX, FXI, lipoproteina Lp(a) i PAI-1 (polimorfizam PAI 4G/5G gena), zatim nedostatak FXII, nedostatak plazminogena i mutacija gena za trombomodulin. Podaci o povezanosti navedenih čimbenika s tromboembolijama u dječjoj dobi su još uvijek oskudni zbog nedostatka studija. Nerijetko su prisutne kombinacije navedenih genetskih poremećaja koje, u različitom stupnju, pridonose povećanju izgleda za nastanak tromboembolije (Bertina et al. 2011).

1.7.1. Mutacije faktora zgrušavanja kao genetički čimbenici trombotičkih stanja

Mi smo u radu ispitivali povezanost ABO genotipova krvnih grupa bolesnika sa tromboembolijskim bolestima uz potvrđene mutacije Faktora V Leiden, protrombina (FII) i enzima metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR C677T) kao genetičke čimbenike za razvoj trombotičkoh stanja.

1.7.1.1. Točkasta mutacija faktor V Leiden (R506Q)

Koagulacijski čimbenik V (proakcelerin) cirkulira u krvi, a sintetizira se u jetri i megakariocitima. Da bi iskazao svoju aktivnost, mora biti aktiviran u čimbenik Va, koji je kofaktor čimbeniku Xa pri pretvaranju protrombina u trombin. Inaktivira ga protein C.

Rezistencija na aktivirani protein C (APC) je čest rizični faktor za razvoj venske tromboze (De Stefano et al. 1995; Dahlback 1995). Aktivirani protein C je serinska proteaza koja se ponaša kao prirodni antikoagulans, tako što inaktivira FVa i FVIIIa. Normalno FVa se inaktivira početnim cijepanjem peptidne veze na karboksilnom kraju arginina 506, iza čega slijedi cijepanje kod arginina 306. FVa se inaktivira cijepanjem kod arginina 306, ali to cijepanje je deset puta sporije bez primarnog cijepanja na poziciji 506, uslijed R506Q mutacije i pomiče koagulacijsku ravnotežu ka nastanku tromba. APC rezistencija je najčešće posljedica točkaste mutacije gena za čimbenik V, poznat kao faktor V Leiden (FVL). Faktor V Leiden mutacija je najčešći oblik nasljedne trombofilije a nasljeđuje se autosomno dominantno. Posljedica mutacije je supstitucija gvanina adeninom na nukleotidnoj poziciji 1,691 što rezultira time da je arginin (triplet CGA) na poziciji 506 zamijenjen glutaminom (triplet CAA). Oznaka mutacije je FV: G1691A ili koristeći oznake za aminokiseline FV R506Q. Heterozigoti za ovu mutaciju imaju doživotno povećan rizik za razvoj venske tromboze 5 do 10 puta, dok je kod homozigota taj rizik povećan čak 50 do 100 puta, ovisno o drugim stečenim čimbenicima. Nekoliko je pedijatrijskih studija pokazalo da je od 10 do 50% djece sa trombozom heterozigotnih nositelja mutacije faktor V Leiden. U bijeloj rasi, učestalost mutacije iznosi oko 5%, dok je iznimno rijetka u crnoj i azijatskoj rasi (Bertina et al. 1994; De Stefano et al. 1998).

Poznate su i druge mutacije gena za faktor V poput Faktor V Cambridge (Arg306Thr) ili Faktor V Hong Kong (Arg306Gln) koje su puno manje zastupljene.

Od velikog interesa je i utjecaj oralnih kontracepcijskih pilula na razvoj tromboze, pogotovo ako je postoji mutacija FV Leiden. Kod žena homozigota za FV G1691A mutaciju, prva tromboza javlja se desetak godina ranije nego kod muškaraca. Ta razlika povezuje se sa utjecajem trudnoće i unosom oralnih kontraceptiva na razvoj tromboze. Prema rezultatima skupine istraživača ispitanice koje su uzimale kombinirane oralne kontracepcijske pilule imale su omjer izgleda (odds ratio – OR) za razvoj tromboze 4, dok je za FVL OR iznosio 8. Zajedno OR iznosio je oko 35. To ukazuje na potreban dodatni oprez pri uzimanju oralnih kontraceptiva, posebno kod žena koje imaju dokazanu mutaciju FV Leiden (Vandenbroucke et al. 1994).

1.7.1.2. Protrombin (FII) G20210A mutacija

Protrombin ili FII je čimbenik zgrušavanja krvi, ključni enzim u procesu hemostaze. Proizvodi se u jetri i njegovom aktivacijom nastaje trombin. Prekusor je serinske proteaze trombina, agonist trombocita i ključni čimbenik u njihovoj aktivaciji i agregaciji. Katalizira pretvorbu fibrinogena u fibrin, aktivirajući FXIII što predstavlja izravnu uključenost u stvaranje ugruška. Također, trombin aktivira i čimbenike V i VIII. Kad se trombin veže s trombomodulinom, glikoproteinom na površini endotelnih stanica, katalizira aktivaciju proteina C, koagulacijskog inhibitora FVa i FVIIIa. Trombin djeluje i na stanice endotela i stimulira stvaranje prostaciklina, von Willebrandovog čimbenika, plazminogena i plazminogen aktivatora inhibitora-1. Protrombin je kodiran genom od 21 kb, smještenom na 11. kromosomu, na poziciji 11p11-q12. Gen za protrombin organiziran je u 14 eksona, razdvojenih sa 13 introna s 5′ uzvodno nekodirajućom (UT) regijom i 3′-UT regijom, koja bi pretpostavlja se, mogla imati regulacijsku ulogu u ekspresiji gena (Poort et al. 1996).

Klinički važna mutacija u genu za protrombin je supstitucija gvanina adeninom na nukleotidnoj poziciji 20210 u 3′-nekodirajućoj regiji. Ta mutacija nađena je kod 18% pacijenata sa venskom trombozom koji su u obitelji imali slučajeve venske tromboze, kod 6% pacijenata s prvom pojavom tromboze i 2% među zdravim kontrolnim ispitanicima. Mutacija G20210A u genu za protrombin također može utjecati na rizik od arterijske bolesti. Među mlađim ženama otkriven je 4 puta veći rizik od infarkta miokarda, među nositeljima FII20210 alela, dok je rizik među muškarcima bio povećan 1,5 puta (DeStefano et al. 2001).

Nositelji 20210AA alela imaju povišenu koncentraciju plazmatskog protrombina za oko tridesetak posto u odnosu na kontrolnu skupinu, nositelje 20210GG genotipa i imaju za oko 2,8 puta veći rizik za nastanak tromboze.

U opsežnom istraživanju od ukupno 5527 ispitanika u 11 centara otkriveno je 111 heterozigotnih nositelja 20210A alela i niti jedan homozigot. Procjenjuje se da su homozigoti iznimno rijetki, 1: 10000 stanovnika (Rosendaal et al. 2002).

1.7.1.3. C677T mutacija enzima metilentetrahidrofolat reduktaze

Hiperhomocisteinemija je stanje visoke koncentracije homocisteina u krvi. Nasljedni oblik je najčešće uzrokovan točkastom mutacijom gena na kromosomu 1 za enzim metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR), pri čemu na poziciji 677 dolazi do zamjene baze citozina u timin (C677T) u slijedu DNA, odnosno zamjenom aminokiseline alanina u valin (A222V), što dovodi do smanjene enzimske aktivnosti, termolabilnosti odnosno smanjene mogućnoti vezanja folata. MTHFR je enzim neophodan u remetilaciji homocisteina u metionin, zajedno sa vitaminom B12 i folnom kiselinom. Stoga se C677T MTHFR mutacija i tretira kao tzv. miješani čimbenik rizika za trombozu, jer se zaštitni utjecaj na homozigotne nositelje ove mutacije može postići dovoljnim unosom vitamina B6, B12 i folne kiseline. Heterozigotni nositelji mutacije nemaju povećani trombotički rizik. Kao posljedica mutacije može doći do nakupljanja homocisteina u organizmu. Iako je teška hiperhomocisteinemija rijetka, učestalost blagog oblika je približno 5-7% u općoj populaciji. Hiperhomocisteinemija je samostalni čimbenik rizika za arteriovaskularne bolesti i trombozu kod odraslih (Frosst et al. 1995; den Heijer et al 2005). Studije su do sada pokazale da je omjer izgleda za razvoj ishemičkog moždanog udara 4.4 puta veći kod djece s hiperhomocisteinemijom nego u kontrolnoj skupini, kao i 3 puta veći relativni rizik za razvoj venske tromboze, osobito u kombinaciji s FVL mutacijom ili protrombin G20210A (Tosetto et al. 1997).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Tromboembolijske bolesti su veliki javnozdravstveni problem u Hrvatskoj, kao i u većini tranzicijskih europskih zemalja i jedan od glavnih uzroka povećanja troškova u zdravstvu. Prema službenom izvješću Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo za 2007 godinu udio osoba umrlih zbog bolesti srca i krvnih žila u Hrvatskoj u ukupnom mortalitetu iznosio je 50,6%, među kojima su vodeće ishemične bolesti srca (36,5%), te cerebrovaskularne bolesti s udjelom od 31,4% . Venska tromboembolija je treći po redu uzrok smrtnosti u Europi sa preko 500.000 smrtnih slučajeva godišnje. Većinu svih slučajeva venske tromboembolije (skoro 60%) čine hospitalizirani bolesnici, a čak kod 5-10% su potvrđene plućne embolije. U SAD-u plućna embolija je uzrok smrti za 150.000 do 200.000 hospitaliziranih bolesnika godišnje. Mnogi bolesnici koji umiru od plućne embolije umiru naglo, tijekom dva sata od pojave akutnih kliničkih simptoma, a to znači da se smrt događa prije početka terapije ili prije nego što je terapija uopće počela djelovati. Prema podacima Američke kardiološke udruge u SAD-u godišnje se bilježi oko 1,5 milijun infarkta miokarda (Roger et al. 2012), a u Velikoj Britaniji oko 300 000 (WHO, 2011).

U izvješću Svjetske zdravstvene organizacije objavljenom 2011. godine 17.3 milijuna ljudi je 2008. godine umrlo u svijetu od kardiovaskularnih bolesti (World Haelth Organisation, 2011). Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u 2009. godini u Hrvatskoj su bolesti srca i krvnih žila vodeći uzrok smrtnosti sa udjelom od 20%. Opća stopa smrtnosti bila je 646 na 100 000 žena i 519 na 100 000 muškaraca (HZJZ, 2010). Do 55. godine života infarkt miokarda je za 5 do 6 puta češći u muškaraca, do 65. godine ta se razlika smanjuje na dva i pol puta. Poslije toga, u starijoj dobi, od infarkta češće obolijevaju žene (McSweeney et al. 2003).

Imajući u vidu ozbiljnost ovih dijagnoza, a istovremeno i neke mogućnosti prevencije, nameće se zaključak da je važno ustanoviti sve čimbenike rizika koji mogu utjecati na prevenciju razvoja bolesti, pravovremeno dijagnosticiranje, a posebno na smanjenje smrtnosti bolesnika u bolnici. Protekla dva desetljeća značajno je unaprijeđena strategija prevencije, dijagnostike i liječenja, ali još uvijek visoka prevalencija tromboembolijskih događaja stavlja

naglasak na istraživanje novih čimbenika rizika za razvoj ove bolesti s ciljem razjašnjenja patogeneze te bržeg prepoznavanja i liječenja.

ABO sustav krvnih grupa uz svoju najznačajniju ulogu u transfuzijskoj i transplantacijskoj medicini sve više je tema istraživanja i drugim granama medicine, psihologije, biologije, nutricionizma, antropologije, pa čak i sociologije. U medicini je sve veći broj objavljenih radova, a i velikih studija koje su u tijeku, a bave se boljim razumijevanjem uloge ABO sustava krvnih grupa u pojavnosti pojedinih bolesti. Za razvoj tromboembolijskih bolesti kao jednog od vodećih javnozdravstvenih problema s kojima se suočava današnje zdravstvo u razvijenim i srednjerazvijenim zemljama definirani su mnogi čimbenici rizika. Ovo istraživanje je pokušaj definiranja značaja povezanosti ABO genotipa krvnih grupa sa pojavnosti tromboembolijskih bolesti u našoj populaciji. Rezultati mogu uputiti na ABO genotipizaciju kao dio obveznih pretraga kod sumnji na razvoj tromboze ili infarkta, a isto tako usmjerenje na pojačavanje preventive kod već postojeće pozitivne obiteljske anamneze vezano uz određenu ABO krvnu grupu.

2. 1. Hipoteza

Hipoteza istraživanja je da se tromboembolije ne javljaju s istom učestalošću kod osoba različitih genotipova ABO krvnih grupa i nositelja dodatnih protrombotičkih genskih čimbenika (faktor V Leiden, protrombin G20210A , C677T MTHFR).

2.2. Ciljevi rada

- uvesti metodu ABO genotipizacije na osnovnih pet alela kao dodatno testiranje u serološkom određivanju ABO kao dopunu pri provođenju transfuzijskog liječenja
- utvrditi učestalost pojedinih alela ABO sustava u zdravoj populaciji tj. u većoj skupini davatelja krvi s nakanom da se taj pool s novim istraživanjima sve više povećava
- ispitati povezanost genotipova ABO sustava krvnih grupa i tri genetska čimbenika trombofilije kao rizika za razvoj venskih i arterijskih tromboembolija
- definirati genotipove ABO sustava povezane s povećanom učestalosti obolijevanja

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Ispitanici

Nakon odobrenja Etičkog povjerenstva Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu istraživanje je načinjeno na 303 uzorka krvi, zdravih, nesrodnih dobrovoljnih davatelja krvi koji ni u osobnoj niti obiteljskoj anamnezi nisu imali tromboemboličkih epizoda. Davatelji su građani Republike Hrvatske, starosne dobi slične kao i ispitivana skupina bolesnika. Prije uzimanja uzorka krvi potpisom su potvrdili pristanak za ispitivanje koje smo planirali učiniti. Uzorci krvi dobrovoljnih davatelja predstavljaju kontrolnu populacijsku skupinu u ovom istraživanju (skupina **K**). Kontrolnu skupinu sačinjavali su 123 žene i 180 muškarca u dobi od 18 do 76 godina.

Drugu skupinu ispitanika sačinjavali su bolesnici sa klinički i laboratorijski potvrđenom dijagnozom venskog tromboembolizma. Prikupljeno je, uz njihov pristanak, 164 uzoraka krvi, među kojima je bilo 60 uzoraka krvi bolesnika sa dijagnozom venske tromboembolije, 69 sa kroničnom venskom bolesti i 35 sa dijagnozom duboke venske tromboze. Uzorci su prikupljeni u Odsjeku za trombocitna i leukocitna protutijela i hemostazu i Odjelu za molekularnu dijagnostiku, Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, te u Klinici za tumore, pri Kliničkom bolničkom centru „Sestre Milosrdnice“. Navedeni bolesnici sačinjavali su ispitivanu skupinu **A**. U njoj su bile 104 žene i 60 muškaraca u dobi od 18 do 86 godina. Za venske tromboze uz simptome koje bolesnik ima, dijagnoza je utvrđena fizikalnim pregledom, laboratorijskim nalazima (D-dimeri), te potvrđena Duplex-ultrazvučnom metodom. Najčešći simptomi pacijenata s dubokom venskom trombozom bili su bolnost i uočljivo oticanje noge u kojoj je nastala duboka venska tromboza. Meka tkiva potkoljenice bila su osjetljiva na dodir, a koža potkoljenice izrazito svijetlocrvene boje. Po svom intenzitetu kod svakog pojedinca simptomi su se razlikovali, pa je dijagnozu DVT uz fizikalni pregled trebalo potvrditi posebnim dijagnostičkim pretragama određivanjem D-dimera, te izvođenjem Duplex-ultrazvučne pretrage. To je potvrđeno kompjutoriziranom kontrastnom tomografijom krvnih žila dubokog venskog sustava.

Treću skupinu (skupina B) sačinjavala su 182 bolesnika s dijagnozama arterijskih tromboembolija (157 bolesnika sa dijagnosticiranim akutnim infarktom miokarda, te 25 bolesnika s drugim vrstama arterijskih tromboembolija), liječenih u KB " Sestre Milosrdnice", Zagreb. Uzorci su uzeti uz potpisan pristanak bolesnika za uzimanje uzorka za znanstveno istraživanje. Bolesnicima je uzeta detaljna anamneza o dobi i životnom stilu, drugim bolestima, trombotičkim epizodama, uz podatke vezane za trudnoću, uzimanje oralne kontracepcije, nadomjesne hormonske terapije, imobilizacije te tromboembolijskim bolestima u obitelji. Skupinu B sačinjavalo je 67 žena i 115 muškaraca u dobi od 20 do 93 godine. Infarkt miokarda karakteriziran uglavnom simptomom snažne boli u prekordiju potvrđen je kardiološkom obradom (karakterističan EKG nalaz – širok i dubok Q zubac, negativan T val, spuštena ST spojnica, a kod nastale nekroze bilježi se izostanak R zupca u QRS kompleksu) i laboratorijskim nalazima (povišeni leukociti, ubrzana sedimentacija, povišena koncentracija staničnih enzima C-reaktivnog proteina, SGOT i LDH).

Svim ispitanicima iz skupina bolesnika (skupine A i B) i iz kontrolne skupine (skupina K) uzet je uzorak od 8.5 mL periferne krvi u epruvetu (Vacutainer ®Plastic PPT) s aditivom poliesterskim polimernim gelom sa suhim K_2EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid).

Uzorci su pripremani za molekularno testiranje u Odjelu za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu. Nakon stajanja na sobnoj temperaturi najviše do 2 sata centrifugirani su 10 minuta na 250 okretaja/min. Nakon toga su zamrznuti na temperaturi od -80ºC. Testiranje je provođeno u više navrata po dvadesetak uzoraka.

3.1.2. Uređaji i kemikalije

Cjelokupno laboratorijsko ispitivanje provedeno je u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Odjelu za molekularnu dijagnostiku sa standardno korištenim priborom i na postojećim uređajima.

3.1.2.1. Laboratorijski uređaji

U provođenju ispitivanja korišteni su laboratorijski uređaji koji su uredno validirani sukladno sustavu osiguranja kvalitete, a nabrojeni su u slijedećoj tablici:

Tablica 3.1. Popis korištenih uređaja, njihove namjene i proizvođača

UREĐAJ	NAMJENA	PROIZVOĐAČ
Magna Pure Compact	uređaj za izolaciju nukleinskih kiselina	Roche Diagnostics, SAD
PCR uređaji AB 2700 i AB 9700	uređaji za umnožavanje fragmenata	Applied Biosystems, SAD
7500 Real-time PCR System	izvođenje RT-PCR	Applied Biosystems, SAD
Elchrom sustav	izvođenje elektroforeze	Elchrom , Švicarska
Kodak kamera	slikanje gelova nakon elektroforeze	Kodak, SAD
Transiluminator	obasjavanje UV svjetlosti	
Centrifuge	centrifugiranje uzoraka	Hettich, Eppendorf 5415R
Termoblok	inkubaciju	Eppendorf
Mućkalica	izolaciju uzoraka	MS2
Sterilni kabineti s laminarnim protokom zraka	odvajanje uzoraka i izradu reakcijske smjese za polimerazne lančane reakcije i RT-PCR	Hereaus i Iskra pio LFVP 9

3.1.2.2. Kemikalije i ostala pomoćna sredstva

Za izolaciju nukleinskih kiselina korišteni su kitovi:

MagNA Pure compact nucleic acid isolation kit I (Roche Diagnostics, SAD)
QIAamp DNA Blood Dna mini kit (Qiagen, Njemačka)

Za amplifikaciju korištena je:

Taq polimeraza (5U/mL),

dNTP (100 mM) (Applied Biosystems, SAD)

Za elektroforezu umnoženih PCR produkata uporabljen je komercijalni gel:Clearose ELC-

3304 EB, PCR Check/T Wide Mini 4X 25 with EtBr (Elchrom, Švicarska)

Za kontrolu veličine PCR produkta korišten je molekularni biljeg od 100 pb (Invitrogen,

1µg/mL)

Za RFLP metodu digestije korišteni su restrikcijski enzimi:

Hind III (10U/µL)

Hinf I (10U/µL), te

10X pufer za digestiju (Invitrogen, SAD)

Za ishodnice i probe za genotipizaciju mutacija FV Leiden i G20210A protrombin

2x Univerzalni master mix

Za genotipizaciju mutacije C677T MTHFR korišten je:

40x TaqMan SNP genotipizacijski za real-time PCR za genetičke čimbenike trombofilije na uređaju ABI 7500 (Applied Biosystems, SAD)

Od standardnog laboratorijskog pribira korišteni su:

Vacutainer epruvete s K_3EDTA (BD Vacutainer, UK) za uzimanje uzoraka krvi,

filter tipsovi od 10, 100 i 1000 µL (Eppendorf, Njemačka),

tipsovi bez filtera za nanošenje na elektroforezu100 µL (Sarstedt, Njemačka),

epruvete od 2 mL za izradu PCR smjese,

PCR epruvetice od 500 µL za pojedinačni uzorak,

stripovi od po 8 jažica i poklopci (Applied Biosystems, SAD).

3.1.2.3. Otopine

Otopine koje su korištene u ispitivanju i njihovi proizvođači:

Bidestilirana voda, Aqua pro injectione	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska
Etanol, 100%	Kemika, Hrvatska
Etidij bromid 10mg/mL	Sigma, Austrija
Pufer za nanošenje uzoraka na gel 5X	Elchrom, Švicarska

Pufer za elektroforezu 1xTAE sadrži 2% 50XTAE, 100 µL etidij bromida (0, 005%)

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija genomske DNA

3.2.1.1. Izolacija genomske DNA iz leukocita periferne krvi pomoću silikatnih gel membrana

Za izolaciju genomske DNA iz leukocitnog sloja (buffy coata) korišteni su komercijalni kitovi QIAamp DNA Blood Mini kita(Qiagen, Njemačka). Silika-gel membrane služe za razdvajanje DNA od drugih komponenti kao što su polisaharidi i proteini. Izolacija DNA temelji se na postupku vezanja-ispiranja-eluiranja. Nukleinske kiseline se adsorbiraju na

silika-gel membranu u prisutnosti kaotropnih soli koje uklanjaju vodu iz hidratiziranih molekula u otopini. Nakon ispiranja s dva različita pufera (AW1 i AW2), nukleinska kiselina se eluira u malom volumenu, pripremljena za uporabu bez daljnjeg ukoncentriravanja. Tako izolirana genomska DNA visokog je stupnja čistoće i zadovoljavajućeg prinosa za izvođenje lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (real-time PCR, od engl. *Polymerase Chain Reaction*).

3.2.1.2.Izolacija genomske DNA iz leukocita periferne krvi pomoću uređaja MagnaPure

MagNA Pure Compact uređaj je robotska radna stanica za automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina iz širokog spektra materijala. Genomska DNA izolirana je iz uzorka trombocitno-leukocitnog međusloja (prema eng. *buffy coat*), uz korištenje MagNA Pure Compact reagentnog kita (Roche Diagnostics Corporation, SAD).

3.2.2. ABO genotipizacija pomoću PCR-SSP metode (alel specifični PCR)

U svrhu određivanja ABO genotipova DDK i bolesnika korištena je PCR-SSP (od engl. *Sequence Specific Primers*) metoda, preuzeta iz literature (Gassner et al. 1996), a modificirana u laboratoriju Odjela za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu.

PCR je lančana reakcija sinteze DNA uporabom enzima DNA polimeraze, tj. postupak umnažanja DNA *in vitro*, u tijeku kojeg se u ciklusima denaturacije, vezanja početnih oligonukleotida (ishodnica) i produljenja lanca, umnažaju ciljni slijedovi gena. Preduvjet za izvođenje reakcije je poznavanje slijeda nukleotida rubnih dijelova odsječka DNA koji se želi umnožiti, na temelju kojeg se konstruiraju ishodnice i postojanje barem jedne početne molekule DNA koja u reakciji ima ulogu kalupa tj. predloška za lanac u nastanku.

PCR-SSP metoda je podvrsta polimerazne lančane reakcije, a metoda se zasniva na nemogućnosti Taq polimeraze da popravi neslaganje u jednoj bazi na 3' kraju DNA

ishodnice. Dakle, kada je nukleotid na 3' kraju ishodnice komplementaran sekvenciji na kraju alela, doći će do umnožavanja (amplifikacije) sekvencije. Kada 3' nukleotid ishodnice nije komplementaran kalupu, neće doći do umnožavanja sekvencije ili će se umnožiti u vrlo maloj količini.

Svim ispitanicima doktorskog rada određivani su glavni ABO alelni geni :O^1, O^2, A^1, A^2 i B pomoću lančane reakcije polimerazom, uz uporabu 8 parova oligonukleotidnih začetnika (primera) specifičnih za određene sekvence pojedinih ABO alela u osam paralelnih PCR reakcija. U svakoj SSP reakciji istodobno je napravljena amplifikacija ulomka gena za humani hormon rasta (Human growth hormon - HGH) kao interna pozitivna kontrola, da bi se potvrdila prisutnost DNA u reakcijskoj smjesi.

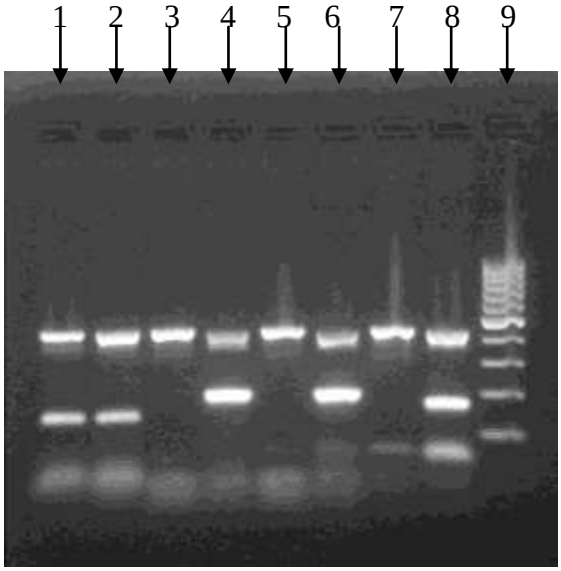
Korištene ishodnice i veličine produkata navedene su u Tablici 3.4.

Tablica 3.2. Ishodnice korištene za ABO genotipizaciju

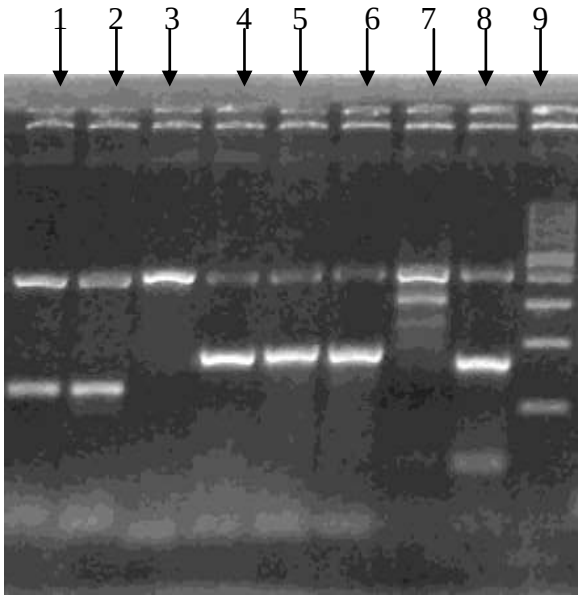
Alel	**Oligo-Nukleotid**	**Sekvenca ishodnice**	**Br. Smjese/PCR produkt (pb)**
0^1	01-r	5'-aTaTat ATG GCA AAC ACA GTT AAC CCA AGT-3'	
	01-a	5'-tTa aGT GGA AGG ATG TCC TCG TcG TA-3'	1/139
	01-b	5'-Ta aGT GGA AGG ATG TCC TCG TcG TG-3'	2/137
0^2	02-r	5'-aGT GGA CGT GGA CAT GGA GTT CC- 3'	
	02-a	5'-tC GAC CCC CCG AAG AAg CT- 3'	3/194
	02-b	5'-CC GAC CCC CCG AAG AAg CC- 3'	4/193
B	B-r	5'- aGT GGA CGT GGA CAT GGA GTT CC- 3'	
	B-a	5'-atC GAC CCC CCG AAG AgC G- 3'	5/195
	B-b	5'-CC GAC CCC CCG AAG AgC C- 3'	6/194

A^2	A2-r	5'-ggG TGT GAT TTG AGG TGG GGA C- 3'	
	A2-a	5'.gAG GCG GTC CGG AAg CG- 3'	7/169
	A2-b	5'- gAG GCG GTC CGG AAC aCG- 3'	8/170
	HGH-a	5'-TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A- 3'	/434
	HGH-b	5'-CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC- 3'	

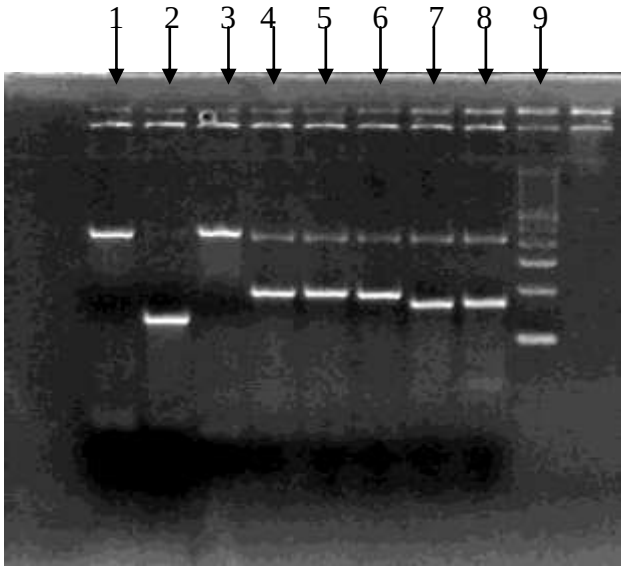
Nakon umnožavanja, detekcija produkata PCR-SSP amplifikacije izvršena je pomoću elektroforeze na gelovima s etidij bromidom, pri naponu od 60-100 V (Sambrook 1989). Etidij bromid je supstanca koja se umrežava u niti DNA, a obasjana UV svjetlom svijetli. Nakon završene elektroforeze, gel se obasjava pod UV transiluminatorom, svjetlošću valne duljine 254 nm, pri čemu se specifični umnoženi ulomci DNA vide kao svijetle vrpce, koje se dokumentiraju pomoću fotografiranja kamerom. Dobivene kombinacije alel-specifičnog PCR-a (prisutnost ili odsutnost umnožene DNA-vrpce za pojedini ABO genotip) očitane su iz tablice 4. ABO aleli i genotipovi imenovani su po nomenklaturi prema podacima Yamamota (Yamamoto 1995).



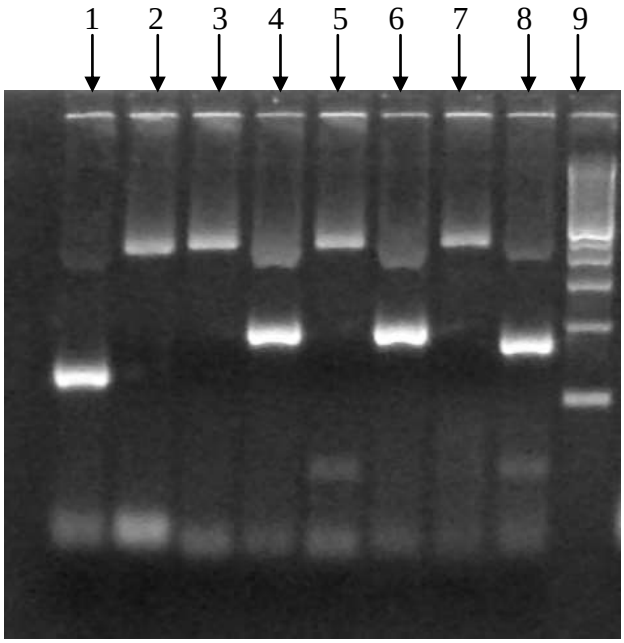
Slika 3.1. Krvna grupa A, genotip O1A1, PCR-SSP metoda, 1,5% agarozni gel. Linije: 1-134 pb, 2-133 pb, 4-193 pb, 6-194 pb, 8-173 pb. Pozitivna interna kontrola 434 pb. Linija 9-molekularni biljeg 100 pb.



Slika 3.2. Krvna grupa B , genotip O1B, PCR-SSP metoda, 1,5% agarozni gel. Linije: 1-134 pb, 2-133 pb, 4-193 pb, 5-195 pb, 6-194 pb, 8-173 pbPozitivna interna kontrola 434 pb. Linija 9-molekularni biljeg 100 pb.



Slika 3.3. Krvna grupa AB, genotip A2B, PCR-SSP metoda, 1,5% agarozni gel. Linije: 2-133 pb, 4-193 pb, 5-195 pb, 6-194 pb,7-172 pb, 8-173 pb. Pozitivna interna kontrola 434 pb. Linija 9-molekularni biljeg 100 pb.



Slika 3.4. Krvna grupa O, genotip O1O1, PCR-SSP metoda, 1,5% agarozni gel. Linije: 1-134 pb, 4-193 pb, 6-194 pb, 8-173 pb. Pozitivna interna kontrola 434 pb. Linija 9-molekularni biljeg 100 pb.

Tablica 3.2. Tablica za očitavanje ABO genotipa

Reakcija br.	1	2	3	4	5	6	7	8		
PCR produkt (pb)	134	133	194	193	195	194	172	173		
Specifičnost	O^1	non O^1	O^2	non O^2	B	non B	A^2	non A^2		
Rezultati:									Genotip:	Fenotip:
Pozicija 1-pozitivna (O^1)	+	-	-	+	-	+	-	+	O^1O^1	O
	+	+	+	+	-	+	-	+	O^1O^2	O
	+	+	-	+	+	+	-	+	O^1B	B
	+	+	-	+	-	+	-	+	O^1A	A
	+	+	-	+	-	+	+	+	O^1A^2	A
Pozicija 3-pozitivna (O^2)	-	+	+	-	-	+	-	+	O^2 O^2	O
	-	+	+	-	+	+	-	+	O^2B	B
	-	+	+	+	-	+	-	+	O^2A	A
	-	+	+	+	-	+	+	+	O^2 A^2	A
Pozicija 5-pozitivna (B)	-	+	-	-	+	-	-	+	BB	B
	-	+	-	+	+	+	-	+	AB	AB
	-	+	-	+	+	+	+	+	A^2B	AB
Pozicije 2/4/6 poz. (non O^1/O^2/B)	-	+	-	+	-	+	-	+	AA	A
	-	+	-	+	-	+	+	+	A A^2	A
	-	+	-	+	-	+	+	-	A^2 A^2	A

3.2.3. Genetički faktori trombofilije

3.2.3.1. Genotipizacija točkaste mutacije faktor V Leiden pomoću PCR-SSP metode

PCR-SSP metoda se koristi za otkrivanje polimorfizma jednog nukleotida pa je za određivanje točkaste mutacije potrebno umnožiti slijed DNA koji sadrži mutaciju G1691A pomoću alel-specifičnih ishodnica. Istovremeno se rade dvije PCR reakcije, jedna s parom ishodnica koje su komplementarne mutiranom alelu, a druga reakcija s parom ishodnica komplementarnim normalnom alelu (divlji tip). U seriji uzoraka uvijek se rade pozitivna (heterozigot za mutaciju) i negativna kontrola (bidestilirana voda) (Tripodi et al. 1997).

Ishodnice za divlji tip:

5′- GAT GAA CCC ACA GAA AAT GA-3′

5′- AAA AGT ACC TGT ATT CCT C-3′

Ishodnice za mutirani tip:

5′-CAG ATC CCT GGA CAG GCA-3′

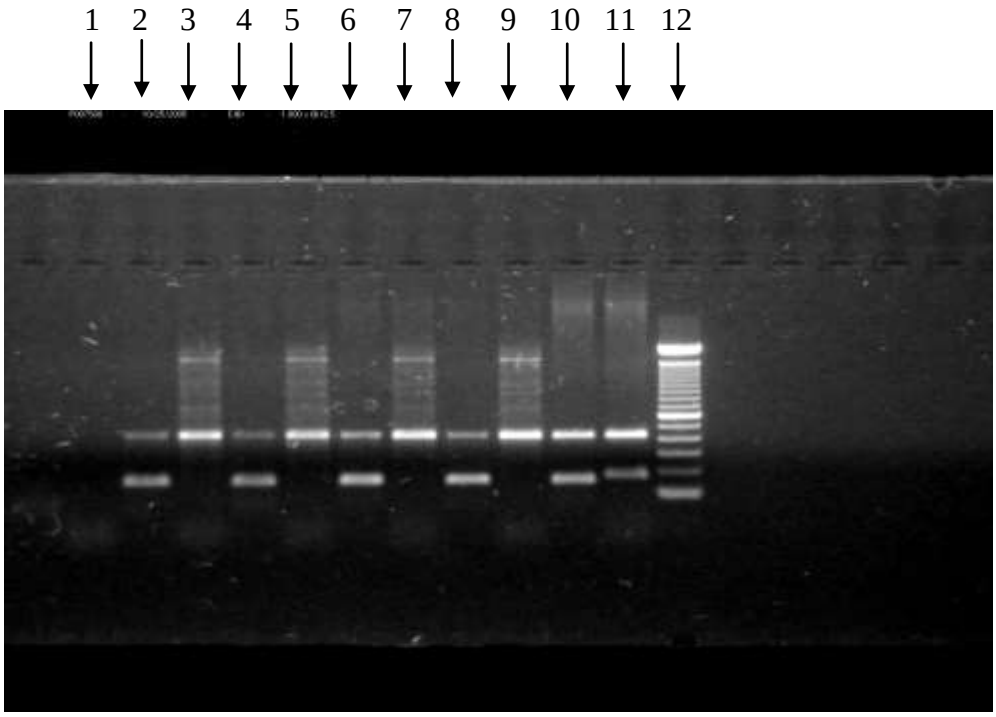
5′-TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA-3′

Ishodnice za hormon rasta:

5′-GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3′

5′-TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C-3′

Genotipizacija mutacije Faktor V Leiden se temelji na prisutnosti ili odsutnosti produkta umnažanja sa svakim parom alel specifičnih ishodnica. U svaku PCR reakciju se stavlja par ishodnica koji umnaža ulomak humanog hormona rasta s kojim se dokazuje uspješnost PCR reakcije i kvaliteta ekstrakcije DNA (pozitivna interna kontrola) (Slika 14.).



Slika 3.5. Prikaz genotipizacije mutacije FV Leiden pomoću PCR-SSP metode-alel specifičnog PCR-a. Elektroforetsko razdvajanje na 1,5% agaroznom gelu.
Linija 1-negativna kontrola; linije 2,4,6, 8,10-normalni alel FVL; linije 3,5,7,9-PCR umnožavanje mutiranog alela FVL, ulomci bez mutacije uz prisutnost pozitivne interne kontrole dio humanog hormona rasta, veličine 434 pb; linija 11-mutirani alel FVL kod heterozigotnog nositelja mutacije FVLeiden; linija 12- molekularni biljeg 100 pb.

Nakon završene PCR reakcije slijedi elektroforeza umnoženih sljedova DNA na 1,5% agaroznom gelu. Na gelu se mogu otkriti tri različita genotipa:

- Divlji tip (normalni aleli)
- Heterozigot za mutaciju (normalni i mutirani alel)
- Mutirani homozigot (oba alela su mutirana).

3.2.3.2. Genotipizacija mutacija G20210A protrombin i C677T metilentetrahidrofolat reduktaze pomoću metode PCR-RFLP *(prema engl. Restriction Fragment Length Polimorphism - polimorfizam restrikcijskih fragmenata)*

Metoda cijepanja umnoženih odsječaka DNA pomoću enzima restrikcijskih endonukleaza jedna je od metoda kojima se otkriva polimorfizam ulomka molekule DNA. Metoda se bazira na postojanju polimorfnog nukleotida u određenom odsječku DNA koji može dovesti do stvaranja novog ili uklanjanja postojećeg restrikcijskog mjesta za određenu restrikcijsku endonukleazu.

Ulomak DNA koji sadrži polimorfni nukleotid se umnoži PCR reakcijom, a zatim se umnoženi produkt pocijepa s određenim restrikcijskim enzimom koji prepoznaje specifičan redoslijed od 4 ili 6 nukleotida na kojem cijepa molekule DNA. Restrikcijski enzim cijepa ili mutirani ili divlji tip. Zatim se fragmenti DNA nastali rezanjem razdvoje elektroforezom na agaroznom gelu, a nastale vrpce postaju vidljive pomoću UV svjetla. Na gelu se mogu otkriti tri različita genotipa: divlji tip, heterozigotni tip i homozigotni mutirani tip (Port et al. 1996).

Protrombin G20210A mutacija

Ishodnice:

5′-TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC-3′

5′-ATA GCA CTG GA GCA TTG AAG C-3′

Reakcija enzimskog cijepanja s restrikcijskom endonukleazom Hind III tijekom inkubacije 3 do 4 sata na 37°C. U svakoj seriji uzoraka radi se pozitivna (heterozigot za mutaciju) i negativna kontrola (bidestilirana voda). Nakon završene digestije tj. enzimskog cijepanja PCR produkta radi se provjera produkata RFLP-a na 3% agaroznom gelu pri čemu se razdvoje fragmenti nastali cijepanjem. Specifični raspored ulomaka na gelu odgovara određenim genotipovima.

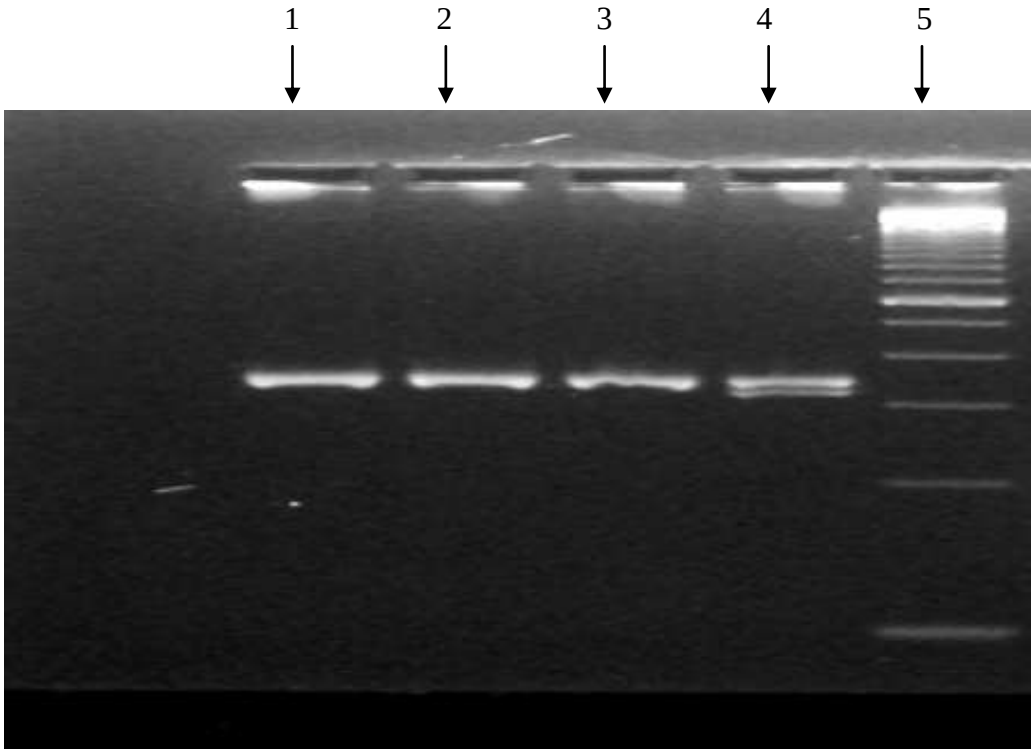
MTHFR C677T mutacija

Ishodnice

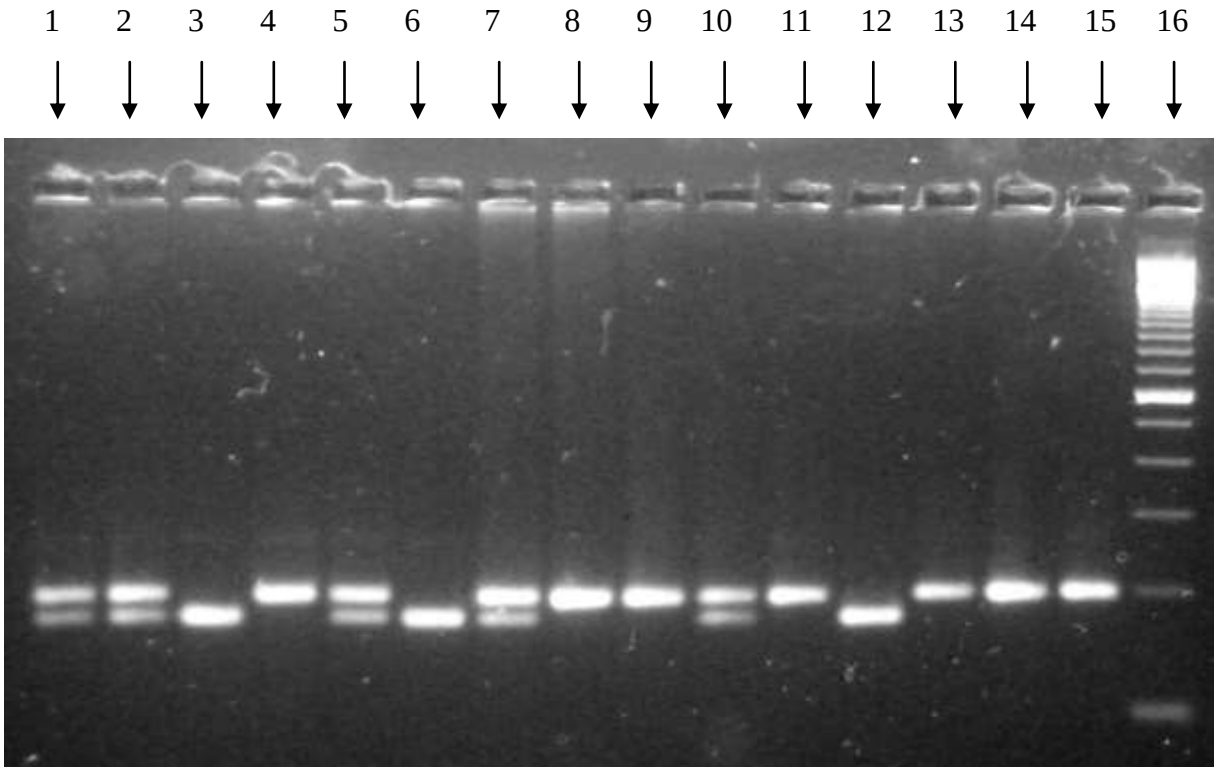
5′-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3′

5′-AGG AAC GGT GCG GTG AGA GTG-3′

Reakcija enzimskog cijepanja s restrikcijskom endonukleazom Hinf I tijekom inkubacije 3 do 4h na 37°C. U seriji uzoraka radi se pozitivna (heterozigot za mutaciju) i negativna kontrola (bidestilirana voda). Postupak provjere produkata RFLP je isti kao i kod određivanja mutacije G20210A u genu za protrombin.



Slika 3.6. Prikaz elferograma na 4% agaroznom gelu nakon digestije ulomka G20210A protrombin mutacije pomoću enzima Hind III
Linije 1-3 normalni genotipovi, bez mutacije, linija 4-heterozigotni nositelj mutacije G20210A protrombin, linija 5-molekularni biljeg 100 pb



Slika 3.7. Prikaz elferograma na 4% agaroznom gelu nakon digestije ulomka C677T MTHFR mutacije pomoću enzima Hinf I
Linije 1,2,5,7,10 - heterozigotni nositelji mutacije C677T MTHFR; linije 3,6,12-homozigotni nositelji mutacije C677T MTHFR, linije 4,8,9,11,13,14,15-normalni genotipovi, bez mutacije; linija 16-molekularni biljeg 100 pb

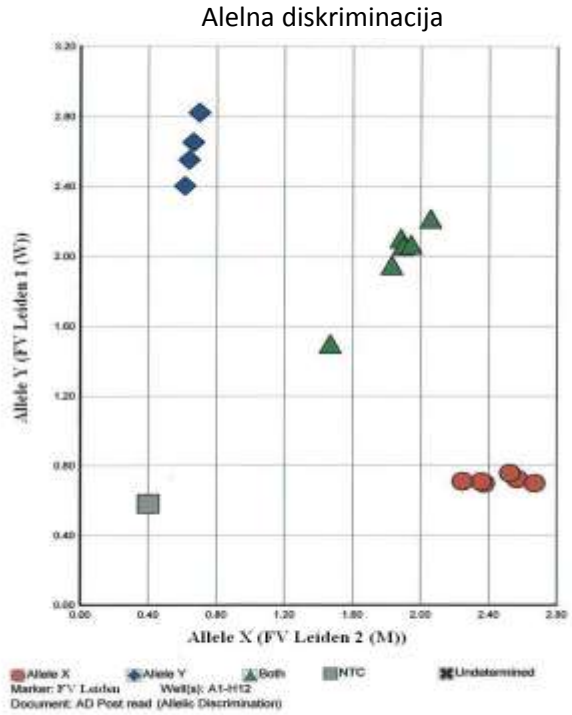
3.2.3.3. Genotipizacija mutacija FV Leiden, G20210A protrombin i C677T metilentetrahidrofolat reduktaze pomoću metode real-time PCR (RT-PCR) tj. lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

Real-time PCR, polimerazna lančana reakcija u stvarnom vremenu, je visoko osjetljiva metoda koja se koristi za umnažanje i istodobnu kvantifikaciju željenih slijedova DNA. Metoda se temelji na 5′-3′ egzonukleaznoj aktivnosti Taq DNA polimeraze koja razgrađuje fluorescentnu probu i dovodi do oslobađanja reporter boje. Pomoću intenziteta emisije fluorescencije reporter boje prati se nastanak PCR produkata tijekom vremena.

RT-PCR metoda zahtijeva dvije dvostruko označene fluorescentne probe (npr. VIC i FAM), od kojih se jedna veže na divlji tip i označava alel 1, a druga se veže na mjesto mutacije i označava alel 2. Proba je oligonukleotid obilježen sa reporter (emitirajućom) bojom na 5′ kraju i quencher bojom (koja gasi) na 3′ kraju.

Dvostruko označena proba se veže za komplementarni dio unutar željenog slijeda DNA koji se umnaža. Kada je proba intaktna, fluorescencija reporter boje je onemogućena blizinom boje koja gasi. Tijekom umnažanja, polimeraza razgrađuje probu, pri čemu dolazi do oslobađanja i odvajanja reporter boje od boje koja gasi, te povećanja fluorescencije reporter boje. Signal fluorescencije se normalizira usklađivanjem emisije intenziteta reporter boje s emisijom referentne boje koja je uključena u reakcijsku smjesu. Taj proces se ponavlja u svakom ciklusu i ne utječe na eksponencijalnu akumulaciju produkta (Tripodi et al. 1997). Intenzitet fluorescencije reporter boje se povećava iz ciklusa u ciklus, razmjerno sa povećanjem količine umnoženog produkta. Amplifikacijska krivulja grafički prikazuje povezanost signala fluorescencije i broja ciklusa umnožavanja. Bazičnu liniju amplifikacijske krivulje čine početni ciklusi umnažanja u kojima ne dolazi do velikih promjena u signalu fluorescencije. Povećanje fluorescencije iznad bazične linije označava detekciju umnoženog produkta. Threshold cycle (Ct) označava broj ciklusa u kojem intenzitet fluorescencije prelazi intenzitet praga. Real-time PCR tehnologija je visoko automatizirana, pri čemu uređaj kontinuirano mjeri fluorescenciju u svim uzorcima tijekom umnažanja, a software te podatke obrađuje i analizira.

Razvoj real-time PCR tehnologije omogućio je jednostavno, brzo i vrlo osjetljivo određivanje točkastih mutacija pomoću alelne diskriminacije (Slika 3.8.).



Slika 3.8. Prikaz alelne diskriminacije nakon provedenog real-time PCR umnožavanja uzoraka za mutaciju FV Leiden na uređaju AB 7500 RT-PCR System

Pojava signala fluorescencije reporter boje je dokaz efikasnosti umnažanja pojedinog alela. Na temelju omjera intenziteta fluorescencije reporter boja (FAM i VIC) može se odrediti koji se alel dominantno umnaža. Ako je umnožen samo divlji tip alela, tj. normalan alel bez mutacije, prisutan je signal fluorescencije reporter boje kojom je označena proba za divlji tip alela. Kod heterozigota s jednim divljim, a drugim mutiranim alelom prisutni su signali obadvije reporter boje, a kod mutiranog homozigotnog alela samo signal reporter boje kojom je označena proba za mutirani alel. Fluorescencija svakog uzorka na kraju umnažanja smješta se u graf s osi x (intenzitet fluorescencije FAM boje) i osi y (intenzitet fluorescencije VIC boje). Iz grafa se lako mogu očitati tri moguća genotipa za neku mutaciju (REF).

Ishodnice za FVL

5′-GAA AGG TTA CTT CAA GGA CAA AAT ACC T-3′

5′-AGA CAT CGC CTC TGG GCT AAT AG-3′

Probe za FVL

FVL1 – FAM 5′-TAT TCC T**C**G CCT GTC C-3′

FVL2 – VIC 5′-TAT TCC T**T**G CCT GTC CAG-3′

Ishodnice za FII G20210A mutaciju

5'-GTT TCT AAA ACT ATG GTT CCC AAT AAA AGT-3'

5'-TGA ATA GCA CTG GGA GCA TTG A-3'

Probe za FII G20210A mutaciju

FII1 – FAM 5'-ACT CTC AGC **G**AG CC-3'

FII2 – VIC 5'-ACT CTC AGC **A**AG CC-3'

Ishodnice i probe za MTHFR C677T mutaciju sadržane su u zatvorenom kitu 20X TaqMan SNP Genotyping Assay, Human, lot. C_1202883_20, Chr 1, d1s2667 (Applied Biosystem, USA) .

3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Statistička obrada rezultata dobivenih za kontrolnu skupinu K i skupine A i B bolesnika sastojala se od statističke usporedbe pomoću odgovarajućih testova za populacijske genetičke analize (frekvencije alela) i usporedbe nebrojčanih podataka (logistička analiza regresije za omjer izgleda-OR, uz 95% interval pouzdanosti, χ^2test).

Statističke metode

Dobiveni rezultati prikazani su apsolutnom i relativnom učestalošću i prikazani su u tablicama. Dob sudionika prikazana je medianom i rasponom.

U obradi dobivenih rezultata koristili su se statistički testovi za usporedbu nezavisnih kategoričkih podataka; χ^2test i Fisherov test za utvrđivanje razine značajnosti razlike između skupina i Omjer izgleda, uz 95% granice pouzdanosti, za procjenu jačine povezanosti

varijabli, odnosno procjenu utjecaja ABO genotipova i genetskih faktora rizika tromboze na razvoj venske i arterijske tromboze (Altman et al. 1995).

Razina statističke značajnosti je postavljena na 0,05 u svim analizama.

Fisherov test korištišten je u analizi statističke značajnosti kada je barem jedna frekvencija u kontingencijskoj tablici bila manja od 5 (<5) (Petrovečki et al. 2010).

Za analizu pojavnosti pojedinih ABO alela korišten je test razlike proporcije (Šimundić et al. 2008).

U analizi rezultata korišten je statistički program MedCalc software version 12.

4. REZULTATI

U istraživanju su obuhvaćene tri skupine ispitanika. Jednu (A) su sačinjavali bolesnici sa dijagnosticiranom venskom trombozom, drugu (B) bolesnici sa akutnim infarktom miokarda koji predstavljaju arterijske tromboembolije i treću (K), kontrolnu - zdravi dobrovoljni davatelji krvi koji u obiteljskoj anamnezi nemaju tromboembolijskih bolesti.

4.1. Rezultati usporedbe skupina bolesnika i kontrolne skupine

Usporedili smo zajedničke rezultate ispitivanih skupina A i B (bolesnici sa venskim trombozama i akutnim infarktom miokarda) sa rezultatima dobivenim u kontrolnoj skupini (K). U skupini bolesnika bilo je ukupno 346 ispitanika, a u kontrolnoj 303.

Tablica 4.1. Podaci o spolu i čimbenicima tromboze kod skupine bolesnika i kontrolne skupine

	žene broj (%)	**muškarci broj (%)**	**median godina (raspon)**	**FVL heterozigot/ homozigot**	**FII G20210A heterozigot/ homozigot**	**MTHFR homozigot C677T**
Skupina bolesnika (A+B) (N=346)	171 (49,4)	175 (50,6)	55 (18-93)	40	12	42
Kontrolna skupina (K) (N=303)	123 (40,6)	180 (59,4)	38 (18-76)	9	10	32

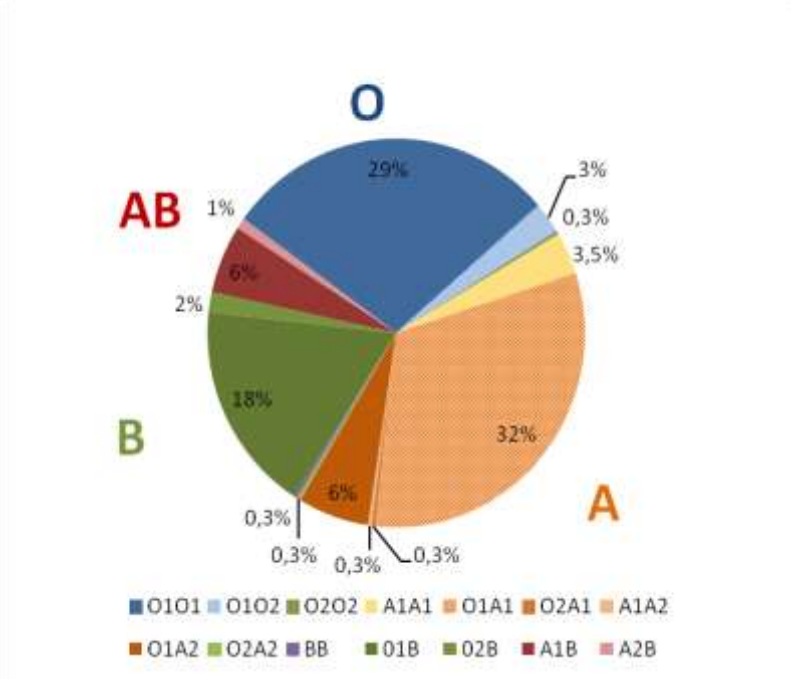
Sumirajući podatke dobili smo jednaku zastupljenost žena (49,4%) i muškaraca (50,6%) među bolesnicima, dok je taj omjer u kontrolnoj skupini na strani muškaraca (59,4%). Povećani broj nalaza nasljednih čimbenika rizika za tromboze kod bolesnika nalazimo samo kod mutacije FV Leiden.

Tablica 4.2. ABO genotipovi kod skupine bolesnika i kontrolne skupine

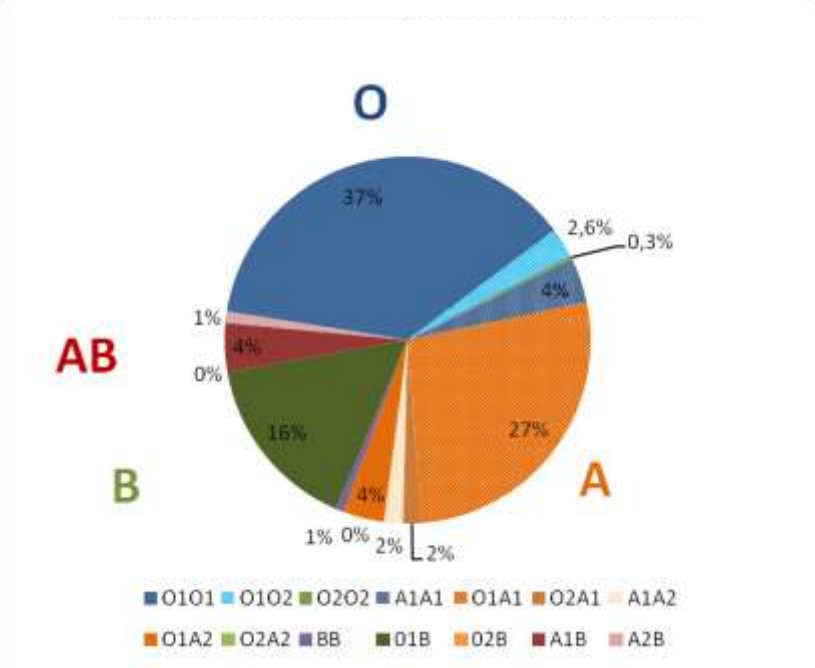
Krvna grupa	Genotip	Bolesnici broj (%)	Kontrolna skupina broj (%)
O	O1O1	99 (28,6)	113 (37,3)
	O1O2	9 (2,6)	8 (2,6)
	O2O2	1 (0,3)	1 (0,3)
A	A1A1	12 (3,5)	12 (4,0)
	O1A1	110 (31,8)	82 (27,0)
	O2A1	1 (0,3)	5 (1,7)
	A1A2	1 (0,3)	5 (1,7)
	O1A2	21 (6,1)	11 (3,6)
	O2A2	1 (0,3)	-
B	BB	1 (0,3)	2 (0,7)
	O1B	61 (17,6)	48 (15,8)
	O2B	6 (1,7)	-
AB	A1B	20 (5,7)	13 (4,3)
	A2B	3 (0,9)	3 (1,0)
UKUPNO		**346**	**303**

U Tablici 4.2. prikazana je raspodjela krvnih grupa bolesnika i kontrolne skupine prema fenotipu i prema genotipu. Među bolesnicima je najzastupljenija A krvna grupa uz vodeći genotip O1A1 čiji su nositelji zastupljeni sa 31.8%. U kontrolnoj skupini najviše je nositelja O1O1 genotipa (37.3%). Njihov postotak među bolesnicima iznosi 28.6%. U fenotipskoj B krvnoj grupi najzastupljeniji je genotip O1B1 i u skupini bolesnika (17.6%) i u kontrolnoj skupini (15.8%). Krvna grupa AB očekivano je češće zastupljena A1B genotipom nego A2B i kod bolesnika i kod ispitanika iz kontrolne skupine.

Grafički prikazi raspodjele prezentirani su na slikama 4.1. i 4.2.



Slika 4.1. Grafički prikaz raspodjele genotipova krvnih grupa u skupini bolesnika

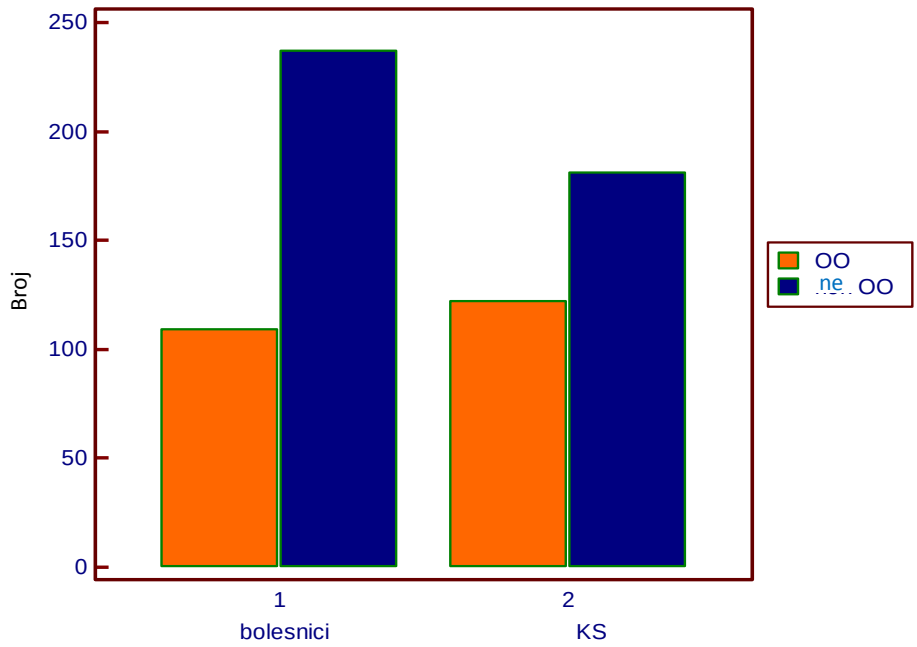


Slika 4.2. Grafički prikaz raspodjele genotipova krvnih grupa u kontrolnoj skupini

Tablica 4.3. Usporedba pojavnosti OO i ne-OO krvne grupe kod bolesnika (A+B skupine) i kontrolne skupine

Krvna grupa	Bolesnici (A+B) broj (%) N=346	Kontrolna skupina (K) broj (%) N=303	Ukupno	Omjer izgleda (95% CI[1]) za trombotički rizik	P (χ^2 test)
OO	109 (47,2)	122 (52,8)	231	1,46 (1,06-2,02)	0,025
ne-OO	237 (56,7)	181 (43,3)	418		

[1] CI=confidence interval, interval pouzdanosti



Slika 4.3. Grafički prikaz usporedbe pojavnosti nositelja OO i ne-OO genotipova u bolesnika i u kontrolnoj skupini

Nositelji OO genotipa među bolesnicima čine 47,2% (109/231), a ne-OO nositelji 56,7 % (237/418). χ^2 testom utvrđuje se kao statistički značajna razlika na razini p=0,025. Omjer izgleda za razvoj tromboze i infarkta, tj. povećani trombotički rizik kod ne-OO nositelja u odnosu na OO nositelje iz dobivenih ukupnih rezultata ispitivanja iznosi OR= 1,46 uz 95% CI : 1,06 – 2,02 iz čega se može zaključiti da su izgledi za razvoj tromboze kod ne-OO

nositelja 1,46 puta veći u odnosu na nositelje genotipa OO (na jednog OO-nositelja koji razvije vensku trombozu ili infarkt miokarda dolazi približno 1,5 ne-OO nositelja). Izračunati omjer izgleda statistički je značajan na razini $p<0,05$ (CI = 1,06 > 1).

Tablica 4.4. Usporedba pojavnosti OO i svih ne-OO genotipova kod bolesnika (A+B skupine) i kontrolne skupine

Genotipovi krvnih grupa	**Bolesnici (A+B) broj (%) N=346**	**Kontrolna skupina (K) broj (%) N=303**	**OR (95% CI)**	**P (χ^2 test)**
A1A1	12 (3,5)	12 (4,0)	1,12 (0,48-2,60)	0,961
A1A2	1 (0,3)	5 (1,7)	0,22 (0,03-1,95)	0,228
O1A1/O2A1	111 (32,1)	87 (27,0)	1,43 (0,98-2,09)	0,083
O1A2/O2A2	22 (6,4)	11 (3,6)	2,24 (1,04-4,83)	0,056
BB/01B/02B	68 (19,6)	50 (16,5)	1,52 (0,97-2,38)	0,083
A1B A2B	23 (6,6)	16 (5,3)	1,6 (0,81-3,20)	0,234
OO	109 (31,5)	122 (40,3)		

[1] CI=confidence interval, interval pouzdanosti

Statističkom obradom utvrđen je veći, ali ne i statistički značajan rizik za obolijevanje od tromboembolijskih bolesti kod nositelja O1A2/O2A2 genotipa nego kod nositelja OO genotipa. Graničnu značajnost postižu i genotipovi O1A1/O2A1 i BB/O1B/O2B, ali bez potvrđene statističke značajnosti.

Tablica 4.5. Usporedba pojavnosti OO i ne- OO krvnih grupa i faktora rizika kod bolesnika (A+B skupine) i u kontrolnoj skupini

Genotipovi krvnih grupa i faktori rizika	Bolesnici (A+B) broj (%) N=346	Kontrolna skupina (K) broj (%) N=303	OR (95% CI[1])	P (χ^2 test / Fisher test)
OO FVL (-)	97 (28,0)	121 (39,9)		#
OO FVL (+)	12 (3,5)	1 (0,3)	*14,97 (1,91-117,15)	0,008
Ne- OO FVL (-)	209 (60,4)	173 (57,1)	1,51 (1,08 - 2,11)	0,02
Ne- OO FVL (+)	28 (8,1)	8 (2,6)	4,36 (1,90-10,01)	<0,001
OO FII (-)	105 (30,4)	120 (39,6)		#
OO FII (+)	4 (1,1)	2 (0,66)	2,29 (0,41-12,73)	0,4250
Ne- OO FV II (-)	228 (65,9)	173 (57,1)	1,51 (1,09-2,09)	0,018
Ne- OO FV II (+)	9 (2,6)	8 (2,6)	1,28 (0,48-3,45)	0,234
OO MTHFR (-)	93 (26,9)	102 (33,6)		#
OO MTHFR (+)	16 (4,6)	20 (6,6)	0,87 (0,43-1,79)	0,859
Ne- OO MTHFR (-)	207 (59,8)	169 (55,8)	1,34 (0,95-1,90)	0,114
Ne- OO MTHFR (+)	30 (8,7)	12 (4,0)	2,74 (1,33-5,67)	0,009

referentna kategorija,* statistička analiza limitirana zbog malog broja slučajeva, [1] CI=confidence interval, interval pouzdanosti

Pozitivni FVL u skupini ne-OO nositelja povećava izglede za razvoj venske tromboze i infarkta miokarda oko 4 puta u odnosu na FVL negativne OO nositelje, dok negativan FVL u skupini ne-OO nositelja povećava izglede za razvoj ovih bolesti oko 1,5 puta.

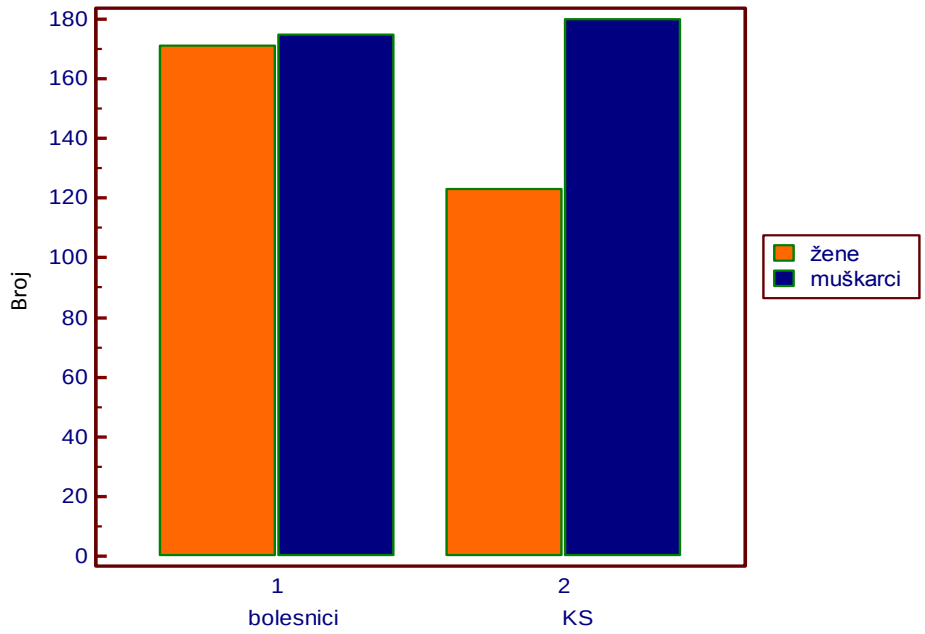
Negativan FII G20210A u skupini ne-OO nositelja povećava izglede za razvoj tromboze i infarkta oko 1,5 puta u odnosu na negativne FII G20210A OO nositelje, dok pozitivan FII u skupini ne-OO nositelja ne povećava izglede za razvoj bolesti.

U skupini ne-OO nositelja, MTHFR 677TT pozitivni, tj. homozigotni nositelji mutacije imaju oko 3 puta veće izglede razvoja tromboembolijskih bolesti od OO nositelja koji su MTHFR 677TT negativni.

Tablica 4.6. Usporedba skupine bolesnika (A+B) i kontrolne skupine prema spolu

Spol	Bolesnici (A+B) broj (%) N=346	Kontrolna skupina(K) broj (%) N=303	Ukupno	OR (95% CI[1])	P (χ^2 test)
Žene	171 (58,2)	123 (41,8)	294	1,43 (1,05-1,95)	P=0,005
Muški	175 (49,3)	180 (50,7)	355		

[1] CI=confidence interval, interval pouzdanosti



Slika 4.4. Grafički prikaz usporedbe skupine bolesnika i kontrolne skupine u odnosu na spol

Incidencija oboljenja kod žena iznosi 58,2% (171/294), a kod muškaraca 49,3 % (175/355), što se χ^2 testom utvrđuje kao statistički značajna razlika na razini p=0,005. Zaključujemo da je incidencija tromboembolijskih bolesti kod žena statistički značajno veća u odnosu na muškarce. Omjer izgleda za razvoj ovih bolesti kod žena u odnosu na muškarce je OR= 1,43 uz 95% CI : 1,05 – 1,95 iz čega se zaključuje da su ti izgledi kod žena 1,43 puta veći u odnosu na muškarce. Izračunati omjer izgleda je statistički značajan na razini p<0,05 (CI = 1,05 > 1).

4.2. Rezultati usporedbe skupine bolesnika s venskim tromboembolijama (A) i kontrolne skupine

Skupinu A sačinjavalo je ukupno 164 bolesnika i podijelili smo ih na tri podskupine: bolesnici sa venskim tromboembolitisom (60), kroničnom venskom bolesti (69) i dubokom venskom trombozom (35). Skupinu K sačinjavalo je 303 zdrava davatelja krvi.

U Tablici 4.7. prikazani su statistički obrađeni rezultati raspodjele bolesnika skupine A i kontrolne skupine (K) prema spolu, dobi i čimbenicima koji povećavaju rizik za razvoj tromboze.

Tablica 4.7. Podaci o spolu, dobi i čimbenicima tromboze kod skupine bolesnika sa venskom trombozom i kontrolne skupine

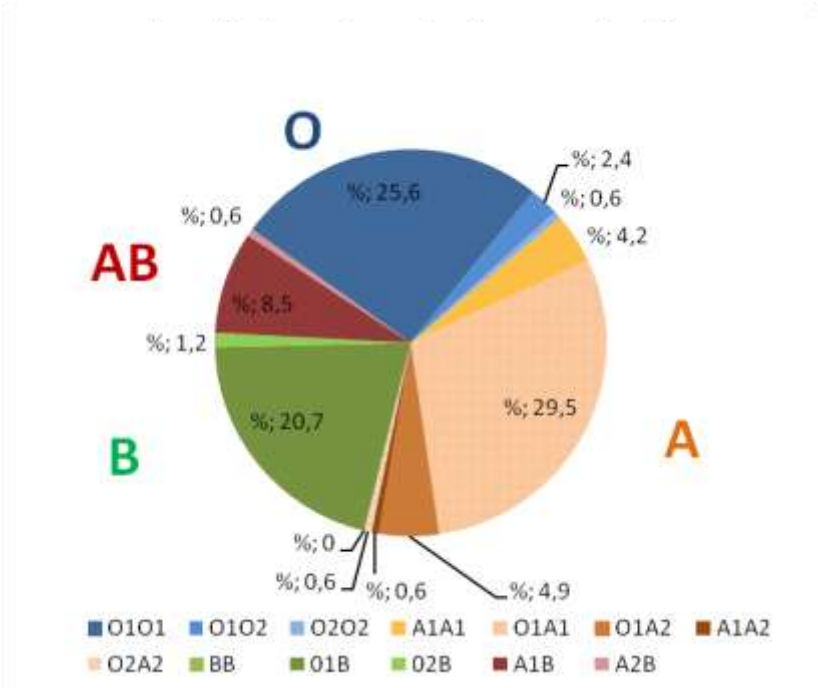
	žene broj (%)	**muški broj (%)**	**Dob**		**Median godina (raspon)**	**FVL heteroz./ homoz.**	**FII G20210A heteroz./ homoz.**	**MTHFR C677T homozigot**
			<45 godina	**>45 godina**				
Skupina A (N=164)	104 (63,4)	60 (36,6)	63 (38,4)	101 (61,6)	52 (18-86)	32 (19,5)	6 (3,7)	24 (14,6)
Skupina K (N=303)	123 (40,6)	180 (59,4)	193 (63,7)	110 (36,3)	38 (18-76)	9 (3,0)	10 (3,3)	32 (10,5)

Iz tablice je vidljivo da je među bolesnicima skoro dvostruko više žena (63,4%) nego muškaraca, dok ih je u kontrolnoj skupini manje (40,6%). Od ukupno 164 bolesnika, 101 (61.6%) su stariji od 45 godina dok je u kontrolnoj skupini više (63,7%) osoba mlađih od 45 godina. Ova dobna granica koristi se u kliničkoj praksi kod donošenja odluke o potrebi laboratorijskog testiranja nasljednih trombofilija što je indicirano u slučajevima sumnji na trombozu kod osoba mlađe životne dobi. Čimbenici koji utječu na povećani rizik za razvoj tromboze su češće otkriveni kod skupine bolesnika nego kod kontrolne, FVL 19.5%, FII 20210A 3,7%, a MTHFR 677TT 14,6%.

Svim bolesnicima iz skupine A, kao i svim davateljima (skupina K) odredili smo ABO genotip i dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 4.8.

Tablica 4.8. ABO genotip kod skupine bolesnika s venskom trombozom i kontrolne skupine

Krvna grupa	Genotip	Skupina A bolesnici broj (%)	Kontrolna skupina broj (%)
O	**O1O1**	42 (25,6)	113 (37,2)
	O1O2	4 (2,4)	8 (2,6)
	O2O2	1 (0,6)	1 (0.3)
A	**A1A1**	7 (4,2)	12 (4,0)
	O1A1	48 (29,5)	82 (27,0)
	O1A2	8 (4,9)	11 (3,6)
	A1A2	1 (0,6)	5 (1,7)
	O2A1	1 (0,6)	5 (1,7)
	O2A2	1 (0,6)	-
B	**BB**	-	2 (0,7)
	O1B	34 (20,7)	48 (15,8)
	O2B	2 (1,2)	-
AB	**A1B**	14 (8,5)	13 (4,3)
	A2B	1 (0,6)	3 (1,0)
UKUPNO		**164(100)**	**303(100)**



Slika 4.5. Grafički prikaz raspodjele bolesnika s venskom tromboembolijom

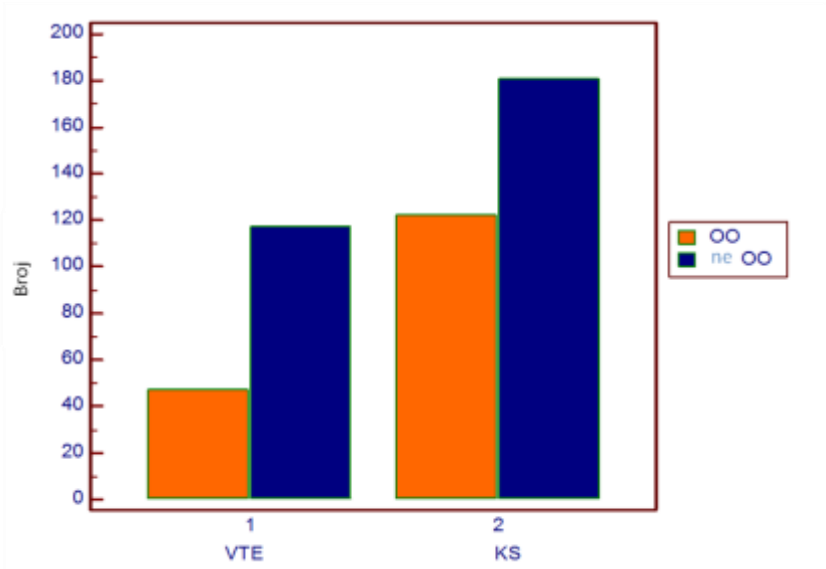
Među bolesnicima najzastupljenija je A krvna grupa (40.4%), a vodeći genotip je O1A1 (29.5%). U kontrolnoj skupini najviše je osoba O krvne grupe (40.1%) sa O1O1 genotipom (37,2%)). Krvna grupa B zastupljena je kod bolesnika sa 21.9% i to uglavnom O1B genotip (20.7%). Među kontrolnim ispitanicima je 16.5% B krvne grupe. I kod bolesnika i kod davatelja krvi najmanje je zastupljena AB krvna grupa, uz očekivano veću zastupljenost A1B genotipa.

Tablica 4.9. Usporedba pojavnosti OO i ne-OO krvne grupe kod skupine bolesnika s venskom trombozom i kontrolne skupine

Krvna grupa	**Skupina A bolesnici broj (%) N=164**	**Kontrolna skupina (K) broj (%) N=303**	**Ukupno**	**OR (95% CI[1]) za vensku trombozu**	**P (χ^2 test)**
OO	47 (27,8)	122 (72,2)	169	1,68 (1,12-2,53)	0,017
ne-OO	117 (39,3)	181 (60,7)	298		

[1] CI=confidence interval, interval pouzdanosti

Incidencija venske tromboze kod nositelja OO krvne grupe iznosi 27,8% (47/164), a kod ne-OO nositelja 39,3 % (117/298), što se X^2 testom utvrđuje kao statistički značajna razlika na razini p=0,017. Zaključujemo da je incidencija venske tromboze kod ne-OO KG statistički značajno veća.



Slika 4.6. Grafički prikaz usporedbe pojavnosti OO i ne-OO krvne grupe kod bolesnika sa venskom trombozom i kontrolne skupine

Omjer izgleda za razvoj tromboze kod ne-OO nositelja u odnosu na OO nositelje iz dobivenih podataka iznosi OR= 1,68 uz 95% CI : 1,12 – 2,53 iz čega se zaključuje da su izgledi za razvoj tromboze kod ne-OO nositelja 1,68 puta veći u odnosu na OO nositelje (na jednog OO nositelja koji razvije trombozu dolaze približno dva ne-OO nositelja koji razviju trombozu), te da je izračunati omjer izgleda statistički značajan na razini $p<0,05$ (jer je donja granica CI = 1,12 > 1).

Tablica 4.10. Usporedba pojavnosti OO i ne-OO genotipova kod skupine bolesnika sa venskom trombozom i kontrolne skupine

Genotipovi krvnih grupa	**Skupina A bolesnici broj (%) N=164**	**Kontrolna skupina (K) broj (%) N=303**	**OR (95% CI[1]) za vensku trombozu**	**P (χ^2 test / Fisher test)**
A1A1	7 (4,3)	12 (4,0)	1,33 (0,48-3,64)	0,081
A1A2	1 (0,6)	5 (1,7)	0,52 (0,06-4,79)	1,000
O1A1/O2A1	49 (29,9)	87 (29,0)	1,50 (0,96-2,66)	0,093
O1A2/O2A2	9 (5,5)	11 (3,6)	2,35 (0,85-6,47)	0,157
O1B/O2B/BB	36 (22,0)	50 (16,5)	1,87 (1,08-3,22)	0,034
A1B/A2B	15 (9,0)	16 (5,3)	2,84 (1,21-6,67)	0,025
OO	47 (28,7)	122 (40,3)		

[1] CI=confidence interval, interval pouzdanosti

Na oba načina (preko OR ili χ^2 testom/Fisher testom) postiže se jednak rezultat; ne-OO nositelji imaju značajno veću incidenciju venske tromboze od OO nositelja i to kod genotipova O1B/O2B/BB i AB/ A2B.

Tablica 4.11. Usporedba pojavnosti OO i ne-OO krvnih grupa i čimbenika rizika kod skupine bolesnika s venskom trombozom i kontrolnom skupinom

Krvna grupa i čimbenici rizika	Skupina A bolesnici broj (%) (N=164)	Kontrolna skupina (K) broj (%) (N=303)	OR (95% CI[1]) za vensku trombozu	P (χ^2 test) / Fisher test)
OO FVL (-)	37 (23)	121 (40)	‡	-
OO FVL (+)	10 (6)	1 (0,3)	32,70 (4,05-2639709)	<0,001*
Ne- OO FVL (-)	95 (58)	173 (57,1)	1,78 (1,15-2,80)	0,013
Ne- OO FVL (+)	22 (13)	8 (2,6)	8,99 (3,70-21,88)	<0,001
OO FII (-)	44 (27)	120 (39,6)	‡	-
OO FII (+)	3 (2)	2 (0,7)	4,09 (0,67-65370)	0,132
Ne- OO F II (-)	114 (69)	173 (57,1)	1,79 (1,18-2,73)	0,008
Ne- OO F II (+)	3 (2)	8 (2,6)	1,02 (0,26-4,03)	1,000
OO MTHFR (-)	39 (24)	102 (33,6)	‡	-
OO MTHFR (+)	8 (5)	20 (6,6)	1,05 (0,43-2,57)	0,895
Ne- OO MTHFR (-)	97 (59)	169 (55,8)	1,50 (0,96-2,34)	0,096
Ne- OO MTHFR (+)	20 (12)	12 (4,0)	4,36 (1,95-9,75)	0,001

‡ referentna kategorija,*statistička analiza limitirana zbog malog broja slučajeva,[1] CI=confidence interval, interval pouzdanosti

Pozitivni FVL u skupini ne-OO nositelja povećava izglede za razvoj tromboze oko 9 puta u odnosu na FVL negativne OO nositelje, dok negativan FVL u skupini ne-OO nositelja povećava izglede za razvoj venske tromboze oko 2 puta.

Negativan FII G20210A u skupini ne-OO nositelja povećava izglede za razvoj venske tromboze oko 2 puta u odnosu na FII G20210A negativne OO nositelje, dok pozitivan FII G20210A u skupini ne-OO nositelja ne povećava izglede za razvoj tromboze.

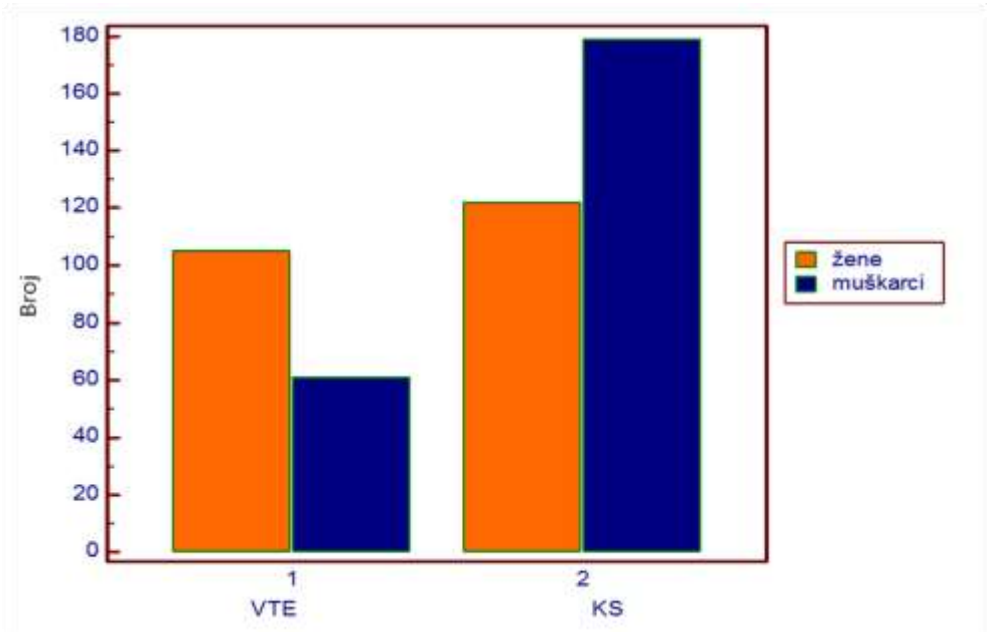
U skupini ne-OO nositelja, MTHFR 677TT pozitivni imaju oko 4 puta veće izglede razvoja venske tromboze od OO-nositelja koji su MTHFR 677TT negativni.

Tablica 4.12. Usporedba bolesnika s venskom trombozom i kontrolne skupine prema spolu

Spol	Skupina A bolesnici broj (%) N=164	Kontrolna skupina (K) broj (%) N=303	Ukupno	OR (95% CI[1]) za vensku trombozu	P (χ^2 test)
Žene	104 (45,8)	123 (54,2)	227	2,53 (1,71-3,75)	<0,001
Muški	60 (25)	180 (75)	240		

[1] CI=confidence interval, interval pouzdanosti

Incidencija tromboze kod žena iznosi 45,8% (104/227), a kod muškaraca 25 % (60/240), što se χ^2 testom utvrđuje kao statistički značajna razlika na razini $p<0,001$. Zaključujemo da je incidencija venske tromboze kod žena statistički značajno veća u odnosu na muškarce.



Slika 4.7. Grafički prikaz usporedba bolesnika s venskom trombozom i kontrolne skupine prema spolu

Omjer izgleda za razvoj tromboze kod žena u odnosu na muškarce je OR= 2,53 uz 95% CI : 1,71 – 3,75 iz čega se zaključuje da su izgledi za razvoj venske tromboze kod žena 2,53 puta veći u odnosu na muškarce i da je izračunati omjer izgleda statistički značajan na razini $p<0,05$ (donja granica CI = 1,71 > 1).

4.3. Rezultati usporedbe skupine bolesnika s arterijskim tromboembolijama - infarkt miokarda (B) i kontrolne skupine

Drugu ispitivanu skupinu (B) sačinjavalo je 182 bolesnika kojima je uz kliničke simptome, kardiološkom obradom i laboratorijskim ispitivanjima dijagnosticiran infarkt miokarda. Usporedili smo identičnim načinom njihove podatke o spolu, dobi i čimbenicima tromboze sa kontrolnom skupinom (K) i dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 4.13.

Tablica 4.13. Podaci o spolu, dobi i čimbenicima tromboze kod skupine bolesnika s akutnim infarktom miokarda i kontrolne skupine. U zagradi su navedeni postoci, a kod medijana raspon godina.

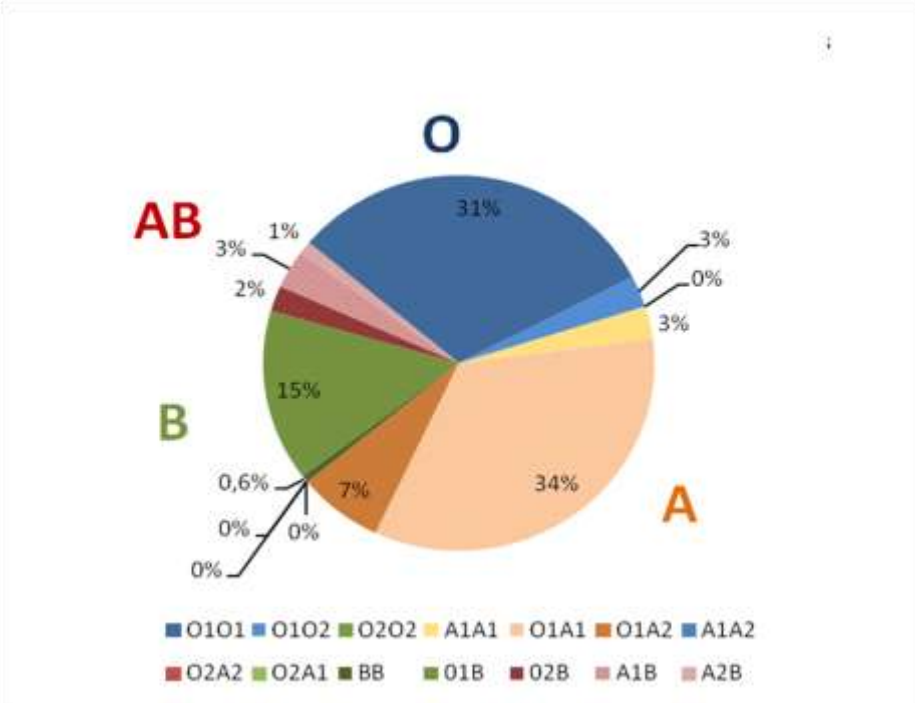
Ispitanici	**Žene**	**muški**	**Dob**		**Median godina**	**FVL heteroz/ homoz.**	**FII G20210A heteroz/ homoz.**	**MTHFR C677T homozig.**
			<55 godina	**>55 godina**				
Skupina B bolesnici (N=182)	67 (36,8)	115 (63,2)	45 (24,7)	137 (75,3)	64 (20-93)	8 (4,4)	6 (3,3)	18 (9,9)
Kontrolna skupina (N=303)	123 (40,6)	180 (59,4)	258 (85)	45 (15)	38 (18-76)	9 (3,0)	10 (3.3)	32 (10,6)

Među bolesnicima je veći broj muškaraca (63,2%) i omjer je sličan kontrolnoj skupini, a medijan dobi je 64 godine uz raspon od 20 do 93 godine. Dobnu granicu od 55 godina postavili smo sukladno kardiološkim zapažanjima prema kojima je pojavnost infarkta miokarda učestalija iznad 55. godine života. Uspoređivanjem nasljednih čimbenika rizika za trombozu ne pronalaze se značajne razlike.

U Tablici 4.14. prikazani su rezultati ispitivanja ABO genotipa kod skupine bolesnika s infarktom miokarda (skupina B) i uspoređeni su sa rezultatima kontrolne skupine. Među bolesnicima su najviše (44.0%) zastupljeni nositelji A krvne grupe, a najvećim postotkom (34.1%) su zastupljeni nositelji genotipa O1A1. U kontrolnoj skupini je 40.2% nositelja O krvne grupe i 38.0% A. Od sva tri genotipa B krvne grupe (BB, O1B i O2B) najviše je zastupljen genotip O1B (14.8% kod bolesnika i 15.8% kod zdravih ispitanika).

Tablica 4.14. ABO genotip kod skupine bolesnika s akutnim infarktom miokarda i kontrolne skupine

Krvna grupa	Genotip	Skupina B bolesnici broj (%)	Kontrolna skupina (K) broj (%)
O	O1O1	57 (31,3)	113 (37,3)
	O1O2	5 (2,7)	8 (2,6)
	O2O2		1 (0,3)
A	A1A1	5 (2,8)	12 (4,0)
	O1A1	62 (34,1)	82 (27,0)
	O1A2	13 (7,1)	11 (3,6)
	A1A2	-	5 (1,7)
	O2A1	-	5 (1,7)
B	BB	1 (0,6)	2 (0,7)
	O1B	27 (14,8)	48 (15,8)
	O2B	4 (2,2)	-
AB	A1B	6 (3,3)	13 (4,3)
	A2B	2 (1,1)	3 (1,0)
UKUPNO		**182**	**303**



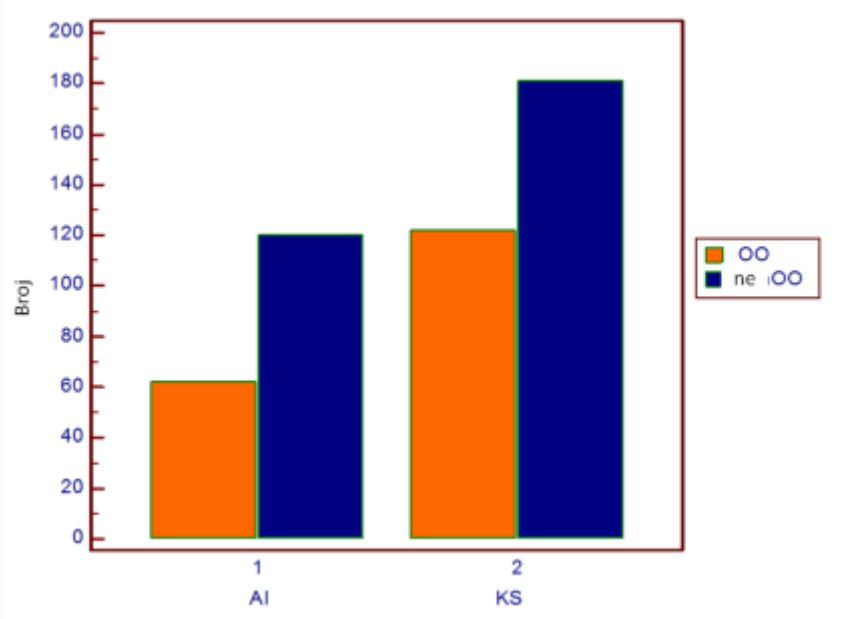
Slika 4.8. Grafički prikaz raspodjele genotipova krvnih grupa u skupini bolesnika s infarktom miokarda

Tablica 4.15. Usporedba pojavnosti OO i ne-OO krvne grupe kod skupine bolesnika s akutnim infarktom miokarda i kontrolne skupine

Krvna grupa	Skupina B bolesnici broj (%) N=182	Kontrolna skupina (K) broj (%) N=303	Ukupno	OR (95% CI[1]) za akutni infarkt	P (χ^2 test)
OO	62 (33,7)	122 (66,3)	184	1,30 (0,89-1,96)	0,206
ne-OO	120 (39,9)	181 (60,1)	301		

[1] CI=confidence interval, interval pouzdanosti

Incidencija akutnog infarkta miokarda kod nositelja OO krvne grupe iznosi 33,7% (62/184), a kod nositelja ne-OO 39,9 % (120/303). X^2 testom se utvrđuje da nema statistički značajne razlike između skupine OO i ne-OO nositelja na razini p=0,206.



Slika 4.9. Grafički prikaz usporedbe pojavnosti OO i ne-OO krvne grupe kod skupine bolesnika s infarktom miokarda i kontrolne skupine

Tablica 4.16. Usporedba pojavnosti OO i ne-OO genotipova kod skupine bolesnika s akutnim infarktom miokarda i kontrolne skupine

Genotipovi krvnih grupa	Skupina B bolesnici broj (%) N=182	Kontrolna skupina (K) broj (%) N=303	OR (95% CI[1]) za akutni infarkt	P (χ^2 test)
A1A1	5 (2,7)	12 (4,0)	0,82 (0,28-2,43)	0,929
A1A2	-	4 (1,3)	-	-
O1A1	62 (34,1)	82 (27,0)	1,49 (0,95-2,33)	0,105
O1A2	13 (7,1)	11 (3,6)	2,33 (0,99-5,49)	0,082
O2A1	-	5 (1,65)	-	-
BB/01B/02B	32 (17,6)	50 (16,5)	1,26 (0,73-2,16)	0,484
A1B A2B	8 (4,4)	16 (5,3)	0,98 (0,40-2,43)	0,846
OO	62 (34,1)	122 (40,3)		

[1] CI=confidence interval, interval pouzdanosti

Na oba načina statističke obrade dobivenih rezultata (preko OR ili χ^2 testom) postiže se jednak zaključak da ne-OO nositelji niti u jednom genotipu nemaju značajno veću incidenciju akutnog infarkta od OO nositelja. Granične rezultate bilježimo samo kod nositelja O1A2 genotipa bez potvrđene statističke značajnosti.

Tablica 4.17. Usporedba pojavnosti OO i ne-OO krvnih grupa i čimbenika rizika kod skupine bolesnika s akutnim infarktom miokarda

Genotipovi krvnih grupa i čimbenici rizika	Skupina B bolesnici broj (%) (N=182)	Kontrolna skupina (K) broj (%) (N=303)	OR (95% CI[1]) za akutni infarkt	P (χ^2 test) / Fisher test)
OO FVL (-)	60 (32,97)	121 (39,9)		#
OO FVL (+)	2 (1,10)	1 (0,3)	4,03 (0,39-45,44)	0,263
Ne- OO FVL (-)	114 (62,64)	173 (57,1)	1,33 (0,90-1,96)	0,182
Ne- OO FVL (+)	6 (3,30)	8 (2,6)	1,51 (0,50-4,56)	0,655
OO FII (-)	61 (33,52)	120 (39,6)		#
OO FII (+)	1 (0,55)	2 (0,66)	0,98 (0,09-11,06)	1,00
Ne- OO FV II (-)	114 (62,64)	173 (57,1)	1,30 (0,88-1,91)	0,225
Ne- OO FV II (+)	6 (3,30)	8 (2,6)	1,48 (0,49-4,44)	0,687
OO MTHFR (-)	54 (29,67)	102 (33,6)		#
OO MTHFR (+)	8 (4,40)	20 (6,6)	0,8 (0,31-1,83)	0,685
Ne-OO MTHFR (-)	110 (60,44)	169 (55,8)	2,0 (1,38-3,01)	0,374
Ne-OO MTHFR (+)	10 (5,49)	12 (4,0)	2,61 (1,07-6,37)	0,451

referentna kategorija, [1]CI=confidence interval, interval pouzdanosti

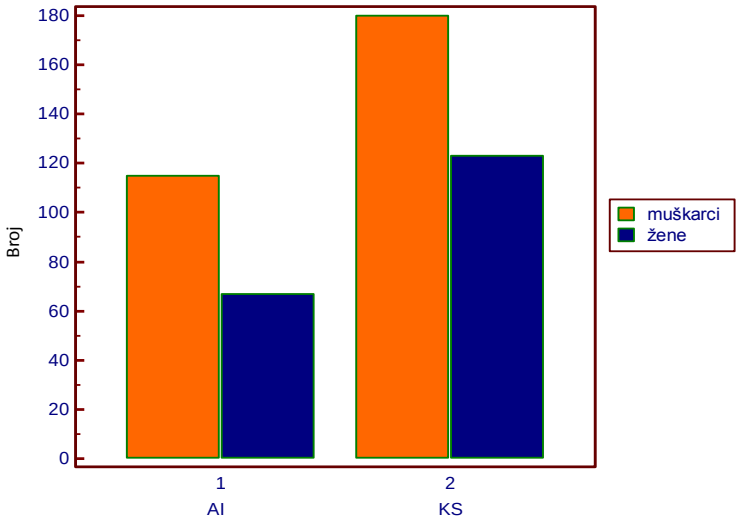
Pozitivni čimbenici za povećani rizik od nastanka tromboze (FVL, F II G20210A, 677 TT MTHFR) niti u jednoj skupini ne povećavaju izglede za razvoj akutnog infarkta miokarda.

Tablica 4.18. Usporedba skupine bolesnika s akutnim infarktom miokarda i kontrolne skupine prema spolu

Spol	Skupina B bolesnici broj (%) N=182	Kontrolna skupina (K) broj (%) N=303	Ukupno	OR (95% CI[1]) za akutni infarkt	P (χ^2 test)
muški	115 (39,0)	180 (61,0)	295	1,17 (0,80-1,71)	P=0,466
žene	67 (35,2)	123 (64,8)	190		

[1]CI=confidence interval, interval pouzdanosti

Incidencija akutnog infarkta kod muškaraca iznosi 39,0% (115/295), a kod žena 35,2 % (67/190). χ^2 testom se utvrđuje da nema statistički značajne razlike između spolova kod pojave akutnog infarkta na razini p=0,466.



Slika 4.10. Grafički prikaz usporedbe skupine bolesnika s infarktom miokarda i kontrolne skupine prema spolu

Tablica 4.19. Usporedba pojavnosti infarkta miokarda u skupini bolesnika i kontrolnoj prema životnoj dobi

Dob (god)	Skupina B bolesnici broj (%) N=182	Kontrolna skupina (K) broj (%) N=303	Ukupno	OR (95% CI[1]) za akutni infarkt	P (χ^2 test)
>55	137 (75,2)	45 (24,8)	182	17,46 (10,99-27,71)	<0,001
<55	45 (14,9)	258 (85,1)	303		

[1]CI=confidence interval, interval pouzdanosti

Incidencija akutnog infarkta osoba starijih od 55 godina iznosi 75,2%(137/182), a kod osoba mlađih od 55 godina incidencija iznosi 14,9% (45/303), što se χ^2 testom utvrđuje kao statistički značajna razlika na razini $p<0,001$. Zaključujemo da je incidencija infarkta kod osoba starijih od 55 godina značajno veća u odnosu na osobe mlađe od 55 godina. Omjer izgleda za razvoj infarkta kod starijih od 55 godina u odnosu na mlađe OR= 17,6 uz 95% CI : (10,99-27,71) iz čega se zaključuje da je izgled za razvoj infarkta kod osoba starijih od 55 godina 17,6 puta veći u odnosu na osobe mlađe od 55 godina. Izračunati omjer izgleda je statistički značajan na razini $p<0,05$ (jer je donja granica CI = 10,99 > 1).

Tablica 4.20. Usporedba pojavnosti akutnog infarkta u skupini bolesnika u različitim dobnim skupinama prema spolu

Spol	Skupina B bolesnici > 55 god. broj (%) N=137	Skupina B bolesnici <55 god. broj (%) N=45	Ukupno	OR (95% CI[1]) za akutni infarkt	P (χ^2 test)
muški	86 (74,8)	29 (25,2)	115	0,93 (0,46-1,88)	0,981
žene	51 (76,1)	16 (23,9)	67		

[1]CI=confidence interval, interval pouzdanosti

Incidencija akutnog infarkta kod muškaraca koji su stariji od 55 godina iznosi 74,8% (86/115) a kod žena 76,1% (51/67). χ^2 testom se utvrđuje da nema statistički značajne razlike prema dobnim skupinama po spolu na razini p=0,981.

4.4. Rezultati usporedbe pojavnosti pojedinih ABO alela u skupini bolesnika i kontrolnoj skupini

U radu je testirano ukupno 649 ispitanika (346 bolesnika sa tromboembolijskim bolestima i 303 zdrave osobe kao kontrolna skupina). Provedeno je 649 genotipizacija i utvrđeno 1298 ABO alela. Ukupna zastupljenost pojedinih ABO alela prikazana je u Tablici 4.21.

Tablica 4.21. Zastupljenost pojedinih ABO alela u svih ispitanika

ABO aleli	Skupine A+B (svi bolesnici) broj (%) N=692	Kontrolna skupina (K) broj (%) N=606	P
O1	397 (57,4%)	375 (62%)	0,103
O2	18 (2,6%)	15 (2,5)	0,9
A1	156 (22,5%)	129 (21%)	0,650
A2	26 (3,75%)	19 (3,5%)	0,927
B	92 (13,3%)	68 (11%)	0,239

Alel O1 je najčešće zastupljen i u skupini bolesnika (57.4%) i u kontrolnoj skupini (62%). U obje skupine najmanju učestalost ima alel O2. Frekvencije u skupini bolesnika su: O1 – 0,57; O2 – 0,03; A1 – 0,023; A2 – 0,04 i B – 0,13, a u kontrolnoj skupini: O1 – 0,63; O2 – 0,025; A1 -0,21; A2 – 0,035 i B – 0,11. Prema dobivenim rezultatima testiranim testom razlike proporcije može se zaključiti da nema statistički značajnih razlika u pojavnosti pojedinih ABO alela u skupini bolesnika i kontrolnoj skupini.

Analizirajući zastupljenost pojedinih ABO alela u skupinama bolesnika koje smo ispitivali dobili smo rezultate prikazane u tablicama 4.22. i 4.23. U skupini A (bolesnici sa venskim trombozama) bilo je 164 bolesnika kojima smo utvrdili 328 alela i usporedili ih sa alelima kontrolne skupine.

Tablica 4.22. Usporedba zastupljenosti pojedinih ABO alela u bolesnika s venskom trombozom i u kontrolnoj skupini

ABO aleli	Skupina A (bolesnici s venskom trombozom) broj (%) N=328	Kontrolna skupina (K) broj (%) N=606	P
O1	176 (54%)	375 (62%)	0,02
O2	9 (2,7%)	15 (2,5)	0,974
A1	78 (24%)	129 (21%)	0,537
A2	11 (3,3%)	19 (3,5%)	0,978
B	51 (16%)	68 (11%)	0,03

Pojavnost O1 alela u kontrolnoj skupini (0,62) je statistički značajno veća u odnosu na skupinu s venskom trombozom (0,54), dok je pojavnost B alela statistički značajno veća u skupini s venskom trombozom (0,16) u odnosu na kontrolnu skupinu (0,11).

Tablica 4.23. Usporedba zastupljenosti pojedinih ABO alela u bolesnika s infarktom miokarda i u kontrolnoj skupini

ABO aleli	Skupina B (bolesnici s infarktom miokarda) broj (%) N=364	Kontrolna skupina (K) broj (%) N=606	P
O1	221 (61%)	375 (62%)	0,808
O2	9 (2,5%)	15 (2,5)	0,832
A1	78 (21%)	129 (21%)	0,817
A2	15 (4%)	19 (3,5%)	0,824
B	41 (11%)	68 (11%)	0,751

Zastupljenost pojedinih alela u skupini bolesnika s akutnim infarktom miokarda i u kontrolnoj skupini nije pokazala statističku značajnost niti za jedan alel. Naprotiv, dobiveni rezultati su u obje skupine gotovo identični.

5. RASPRAVA

Nakon otkrića ABO sustava početkom 20. stoljeća i praktične primjene znanja o neophodnoj kompatibilnosti između davatelja i primatelja krvi u bolnicama, počeci transfuzijske medicine u Hrvatskoj sežu u daleku prošlost. Prvo registrirano transfuzijsko liječenje u Hrvatskoj provedeno je 1923. godine u Petrovoj bolnici. Tek iza 2. svjetskog rata započelo je sustavno provođenje transfuzijske djelatnosti u Hrvatskoj. Organizirani rad sa davateljima krvi, testiranje krvi i klinička primjena krvi i pripravaka primateljima koji su vitalno ugroženi zbog gubitka krvi, uvedeno je pedesetih godina prošlog stoljeća. Od tada pa sve do danas, kada se u cijelom procesu od davatelja krvi do kliničke primjene pripravaka primjenjuju moderni i sofisticirani postupci i glavna je težnja postizanje što veće podudarnosti između davatelja i primatelja te što sigurnije transfuzijsko liječenje, glavnu ulogu i dalje ima ABO sustav krvnih grupa.

Poznato je da učestalosti gena tj. frekvencije gena za polimorfizme krvnih grupa uglavnom služe kao biljezi pojedinih populacija i rasa. Rezultati ispitivanja populacijske genetike za ABO sustav utvrdili su najvišu učestalost O gena (>0,7) u Americi i nekim dijelovima Afrike i Australije, dok učestalost O gena nije bila tako velika na europskom i azijskom kontinentu. Frekvencija O2 alela iznosi u Europi od 0,017 do 0,033, a uopće ga nema u istočnoj Aziji. Učestalost alela A je relativno visoka u Europi (0,25-0,55), zastupljenost je veća od 0,45 kod Aboridžina na jugu Australije, a do 0,35 kod američkih starih plemena. Alel A2 uglavnom se nalazi u Europi i Africi, gdje ne prelazi učestalost od 0,1 a drugdje u svijetu je veoma rijedak. Frekvencija B alela u Europi varira od 0,15 na istoku do <0,05 na zapadu, u Nizozemskoj i Francuskoj. Najviša frekvencija alela B je u Aziji (0,2-0,3), dok ga gotovo nema kod američkih starosjedilaca i australskih Aboridžina (Daniels et al. 2009).

U hrvatskoj populaciji najčešća je krvna grupa A (41%), zatim slijede krvne grupe O (39%), B (15%), a najmanje je zastupljena krvna grupa AB (5%). Dosada nije provedena studija ispitivanja genotipova ABO krvne grupe u hrvatskoj populaciji. U ovom radu

načinjena je genotipizacija 303 dobrovoljna davatelja krvi pomoću PCR-SSP metode na 5 osnovnih alela : O1, O2, A1, A2 i B, koja omogućuje razlikovanje 15 ABO genotipova. Treba naglasiti da su dobrovoljni davatelji krvi (DDK) koji dolaze na Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, koji nastanjuju Zagreb i širu zagrebačku regiju, reprenzentativan uzorak pučanstva zemljopisnog porijekla iz cijele Hrvatske. Genotipizacijom kontrolne skupine, tj. DDK utvrđeno je 12 od 15 genotipova. Najzastupljeniji je bio O1O1 (37,2%), pa slijede O1A1 (27,1%), O1B (15,8%), A1B (4,3%), A1A1 (4,0%), O1A2 (3,6%) i O1O2 (2,6%), A1A2 (1,7%), O2A1 (1,7%), A2B (1,0%), BB (0,7%), O2O2 (0,3%). Među ispitivanim davateljima nije bilo utvrđeno 3 rijetka ABO genotipa : A2A2, O2A2, O2B. Kako bismo odredili specifičnost metode ABO genotipizacije, usporedili smo ABO fenotip (A, B, O i AB) koji je bio zabilježen u kartonu davatelja, s određenim genotipom ABO pomoću PCR-SSP metode. Utvrđena je 100 % korelacija između određenog genotipa i fenotipa. Izračunali smo i alelnu frekvenciju za 5 osnovnih alela i rezultati su: O1 – 0,63; O2 – 0,025; A1- 0,21; A2 – 0,035 i B – 0,11. Najveća je bila frekvencija O1 alela, slijedi A1, a najmanja je pojavnost O2 alela u hrvatskoj populaciji. Kada to usporedimo sa prije navedenim frekvencijama ABO alela u svijetu, razdioba alela u Hrvatskoj je usporediva sa drugim europskim narodima. Prema učestalosti B alela, više se ipak priklanjamo istoku Europe, a možemo pretpostaviti da je to najviše uslijed migracija stanovništva u prošlosti.

Rezultati naše studije dobiveni usporedbom bolesnika iz skupine venskih tromboembolija (VTE) sa kontrolnom skupinom pokazali su da je incidencija venske tromboembolije kod nositelja ne-OO krvne grupe statistički značajno veća (OR 1,68; 95% CI[1] : 1,12 – 2,53) u odnosu na nositelje OO krvne grupe. Iz dobivenih rezultata se zaključuje da su izgledi za razvoj tromboze kod ne-OO nositelja 1,68 puta veći u odnosu na OO nositelje, te da je izračunati omjer izgleda statistički značajan na razini $p<0,05$. Analizom genotipova ne-OO nositelja utvrđen je veći rizik za razvoj tromboze kod nositelja krvne grupe B, točnije za genotipove O1B/O2B/BB (OR 1,87; 95% CI 1,08-3,22) i krvne grupe AB, točnije genotipove A1B/A2B (OR 2,84; 95%CI 1,21-6,67) koji imaju značajno veću incidenciju venske tromboze od OO nositelja. Prema tim rezultatima i alel A1 i alel B su uključeni u povećan rizik za razvoj tromba, kao najvažnijeg kliničkog simptoma u tromboembolijskim bolestima. Ipak, statistički značajan trombotički rizik bio je puno veći

kod nositelja alela B, nego kod nositelja A1 alela. Tome govori u prilog i omjer izgleda trombotičkog rizika za genotipove O1A1/O2A1 OR 1,50; 95%CI (0,96-2,66) koji je statistički graničan. Alel A2 čini se ne nosi trombotički rizik, što pokazuju omjeri izgleda za genotipove A^1A^2 (OR 0,52) i O^1A^2/O^2A^2 (OR 2,35; 95%CI 0,85-6,47) koji nije statistički značajan. A2 alel je prisutan u genotipu A2B, međutim trombotički čimbenik rizika potječe uglavnom od B alela u tom genotipu, jer je zastupljenost A2 alela u Hrvatskoj vrlo mala (0,035). Moguće je, ali manje vjerojatno, da mali broj rijetkih genotipova ABO, prisutnih u našoj studiji, ili općenito prisutnih u veoma malom postotku u hrvatskoj populaciji, može biti uzrokom pogrešnih statističkih zaključaka.

Vrlo slični su rezultati velike nizozemske studije LETS, Morelli-a i suradnika koja je pokazala da su ne-OO genotipovi značajan rizični čimbenik za razvoj venske tromboze, uz OR 1,8 (95% CI: 1,4-2,4), što se može usporediti s našim rezultatima (OR 1,68). Ipak, oni su zaključili da su svi ne-OO genotipovi, osim genotipova A2A2 ili O1A2, povezani sa povećanim rizikom (Morreli et al. 2005). Wu i suradnici načinili su meta analizu svih studija izabranih po određenim kriterijima, koje su ispitivale povezanost ABO krvnih grupa i vaskularnih bolesti i dobili su skupne OR vrijednosti od 1,25 za infarkt miokarda, OR 1,45 za periferne vaskularne bolesti, OR 1,14 za cerebralnu ishemiju arterijskog porijekla i OR 1,79 za venske tromboembolije. Pri tome najveći rizik za venske tromboembolije ima kombinacija alela A^1A^1/ A^1B/BB uz OR 2,44. Potvrđena je povezanost nositelja ne-OO krvnih grupa sa vaskularnim bolestima, iako je potrebno dalje razlučiti koliki rizik nosi utjecaj smanjene ekspresije O(H) antigena na trombozu. Autori smatraju da ima smisla razmisliti o uvođenju ABO tipizacije kod evaluacije osoba s trombofilijom, posebno za A^1A^1/A^1B i BB genotipove s povišenim vrijednostima vWF antigena. Dakle, meta-analiza studija povezanosti između vaskularnih bolesti i ABO pokazuje skupni OR 1,79 za venske tromboembolije, što je također veoma blizu našeg omjera izgleda za povezanost venskih tromboembolija i genotipova ABO sustava krvnih grupa (Wu et al. 2008).

Tirado i suradnici ispitivali su utjecaj ABO krvnih grupa i vrijednosti F VIII na razvoj venske tromboembolije i utvrđeno je da visoke vrijednosti F VIII i ne-O krvne grupe, posebno u kombinaciji s A1 alelom, predstavljaju nezavisne faktore rizika za venske tromboembolije i treba ih uzeti u obzir kod evaluacije trombofilije (Tirado et al. 2005).

Larsen i suradnici iz Danske ispitivali su moguću povezanost ABO krvnih grupa s rizikom za venske trombembolije u trudnoći i babinju, te utvrdili da trudnice s A ili AB krvnom grupom imaju dva puta povećani rizik za VTE tijekom trudnoće u odnosu na O krvnu grupu, dok nije utvrđen povišeni rizik za B krvnu grupu. Nasuprot tome, GOAL studija ispitivanjem 4000 trudnoća u Velikoj Britaniji nije pokazala utjecaj ABO i FVL na hemoragične i trombotičke vaskularne komplikacije u trudnoći (Larsen et al. 2005).

Naši rezultati pokazali su da prisutnost mutacije FV Leiden povećava rizik za razvoj venske tromboze za oko 9 puta kod ne-OO nositelja i preko 30 puta kod nositelja OO genotipova (OR 32,70). Međutim, da ne bi došlo do pogrešnih zaključaka, treba naglasiti da je previsoki OR (32,70) kod nositelja genotipova OO, posljedica toga da je zastupljenost mutacije FVL u kontrolnoj skupini bila ekstremno niska (utvrđen je samo jedan ispitanik studije koji je bio heterozigotni nositelj mutacije), te je široki raspon pouzdanosti uslijed male veličine uzorka. Već kad bi bila nađena dva nositelja mutacije, omjer izgleda bi bio dvostruko manji, što pokazuje ograničenja statističke analize kod manjih sudionika studije, ili kod male zastupljenosti svojstva ili ciljnog pokazatelja koji tražimo u nekoj skupini, a svojstveno je za određenu populaciju (Altman et al. 2000). Kod ne-OO nositelja pozitivnih za FV Leiden mutaciju, rizik za vensku trombozu se povećava devet puta, OR 8,99; 95% CI (3,70-21,88) u odnosu na nositelje OO koji su negativni za istu mutaciju.

Prema radu Morelli-a i suradnika, O nositelji/ negativni za mutaciju FV Leiden, u odnosu na O/ FV Leiden pozitivne nositelje, imali su povećan rizik za trombozu uz OR 4,6 (95% CI: 2,0-10,1), dok usporedbom O /FV Leiden negativnih nositelja s ne-O /FV Leiden pozitivnima, pripadajući omjer izgleda iznosi: OR 23,2 (95% CI: 9.1-59.3) (Morreli et al. 2005). Unatoč razlici u omjerima izgleda opaženima u našoj i talijanskoj studiji, može se izvesti identičan zaključak, a to je da ta kombinacija genotipova ABO krvnih grupa i mutacije FV Leiden predstavlja čimbenik rizika za razvoj venske tromboze. Ako uzmemo u izračun OR samo za ne-OO genotipove i rizik za venske tromboembolije koji iznosi 1,68 i OR od 8,99 za kombinaciju ne-OO genotipova s FVL, rizik za venske tromboembolije se povećava za više od pet puta (5,35).

Matýšková i suradnici ispitivali su utjecaj ABO krvnih grupa i faktora V Leiden kod bolesnika s trombofilijom u Češkoj i ustanovili da je za 1,76 puta veći trombotički rizik kod nositelja FVL s ne-O krvnom grupom u odnosu na O krvnu grupu (Matýšková et al. 2002).

Istraživanje koje su proveli Robert i suradnici na 147 heterozigotnih FVL nositelja sa simptomima tromboze i 23 nositelja bez simptoma, pokazalo je da ne-OO nositelji FVL imaju oko 4 puta veći rizik za razvoj tromboze u odnosu na OO nositelje krvne grupe (OR 3,9; 95%CI: 1,7-8,8) (Robert et al. 2000).

Procare-GEHT skupina ispitivala je utjecaj ne-O KG kao čimbenika rizika za razvoj tromboze kod homozigotnih FV Leiden nositelja, koji su inače vrlo rijetki kod populacija bijelaca. Potvrđen je visoki rizik mutacije koja zahvaća oba alela na trombotički rizik (OR 4,1; 95% CI: 1,9-8,9) (Procare-GEHT group 2006). Usporedba utjecaja ABO krvnih grupa i homozigotnih nositelja FVL u našoj studiji nije bila moguća, jer nije pronađen niti jedan homozigot za mutaciju u kontrolnoj skupini.

Prevalencija ne-O krvne grupe i mutacije FV Leiden kod bolesnika s venskom trombozom bila je predmet istraživanja LITE studije (Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology). Autori istraživači su utvrdili omjer izgleda OR 1,64 (95% CI: 1,32-2,05) kod bolesnika s venskom trombozom i ne-O krvnom grupom. Prisutnost mutacije FV Leiden dodatno povećava rizik na OR 6,77. Zanimljivost je da su Afro-Amerikanci koji su bili uključeni u studiju imali veći omjer krvne grupe O i veću prevalenciju venske tromboze, ukazujući na to da neki drugi čimbenici rizika, a ne samo krvna grupa mogu doprinijeti trombotičkom riziku. Ti dodatni čimbenici su prema autorima pretilost, dijabetes melitus i povišena razina koagulacijskog čimbenika VIII (Ohira et al. 2007). Bezemer i Rosendaal ispitivali su nove prediktivne genetičke varijante za vensku trombozu i navode da su ABO krvne grupe, haplotipovi gena za fibrinogen, FV i FVIII, polimorfizam FXIII Val34Leu, moguće nove prediktivne varijante za razvoj bolesti (Bezemer et al. 2007). Meta analiza Wu i suradnika utvrdila je OR za nositelje FVL i ne-O krvne grupe 3,88, a nijedna studija uključena u meta analizu nije pokazala utjecaj protrombin G20210A mutacije na povećanje trombotičkog rizika (Wu et al. 2008).

Prema rezultatima naše studije, također se protrombin G20210A mutacija nije pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika u kombinaciji s OO i ne-OO genotipovima krvnih grupa. Iako, OO nositelji protrombin mutacije imaju 4,09 puta veći izgled za razvoj tromboze, to nije statistički značajno 95%CI (0,67-65), dok kod ne-OO nositelja mutacija protrombin ne utječe na razvoj venske tromboze (OR 1,02 (0,26-4,03).

Isti rezultat koji govori u prilog činjenici da navedena mutacija u ulomku gena za protrombin ne povećava sklonost razvoju venske tromboze dobiven je u istraživanju Ordonez-Gonzaleza i suradnika (Ordonez-Gonzalez et al. 1999).

Vrlo su vrijedni rezultati studije Minana i suradnika koji su ispitivali utjecaj ABO genotipova krvne grupe na venske i arterijske tromboze kod velikog broja nositelja (981) FVL ili protrombin G20210A polimorfizama. Oni su izvijestili da ne-OO KG nije povećala rizik od infarkta miokarda kod nositelja FVL ili protrombin G20210A mutacija. Suprotno tome, potvrdili su ranije utvrđeni rizik za razvoj venske tromboze među nositeljima FVL koji su imali ne-OO krvnu grupu (OR 1,76). To je prva velika studija koja je pokazala da kombinacija ne-OO krvne grupe i protrombin mutacije povećava rizik za vensku trombozu, uz OR 2,17. Rezultati su čak još više vjerodostojni, jer oni pri izračunu nisu uzeli u obzir genotipove A_2A_2 i A_2O koji nemaju povišene vrijednosti vWF čimbenika (Minano et al. 2008).

Ako ponovo razmotrimo naše rezultate, moguće je da povećan rizik uz protrombin G20210A mutaciju nismo opazili uslijed relativno niske učestalosti nositelja ove mutacije među kontrolnom skupinom i bolesnicima, iako se prisustvo ove mutacije u našoj zdravoj populaciji bitno ne razlikuje u odnosu na ostale srednjoeuropske zemlje.

U ovom istraživanju također je ispitivan utjecaj homozigotnih nositelja MTHFR C677T mutacije, s obzirom da heterozigotni nositelji nemaju povećani rizik za razvoj tromboze. Usporedbom OO/ MTHFR negativnih nositelja sa ne-OO /pozitivnim MTHFR nositeljima, pokazalo se da je ova kombinacija čimbenika rizika statistički značajna za ne-OO nositelje i homozigotne MTHFR - OR 4,36 95% CI (1,95-9,75). Ipak treba dodati da izolirana mutacija MTHFR C677TT nije čimbenik rizika za razvoj tromboze, osim kada je udružena s nekim drugim genetičkim (ne-OO krvne grupe) ili stečenim čimbenikom rizika,

što se pokazalo i u ovom ispitivanju, kao u i drugim dosad provedenim (Bezemer et al. 2007, Tosetto et al. 1997, Procare-GEHT group 2006).

Opaženi omjer izgleda za razvoj tromboze kod žena u odnosu na muškarce bio je OR 2,53 uz 95% CI: 1,71 – 3,75, iz čega se zaključuje da su izgledi za razvoj venske tromboze kod žena 2,53 puta veći u odnosu na muškarce i da je izračunati omjer izgleda statistički značajan na razini $p<0,05$. Ovaj rezultat posebno ne začuđuje, s obzirom da sve žene imaju povećani rizik za nastanak ugruška tijekom reproduktivnog razdoblja zbog tzv. prijelaznih rizičnih čimbenika tijekom života žene, a to su oralna hormonska kontracepcija, trudnoća, obstetričke komplikacije, hormonske varijacije te nakon menopauze uzimanje hormonske nadomjesne terapije (Martinelli et al. 2006).

Osim ispitivanja utjecaja genotipova ABO krvne grupe i protrombotičkih genetičkih čimbenika na razvoj venskih tromboembolija, drugi dio rada bio je posvećen istraživanju rizika za infarkt miokarda, tj . arterijske tromboembolije. Nakon dokazanog povećanog rizika za VTE od 1,68, rezultati drugog dijela rada nisu pokazali da određeni ne-OO genotip nosi rizik za razvoj infarkta miokarda u odnosu na OO genotipove (OR 1,30; 95% CI 0,89-1,96). Granični rezultati nađeni su samo kod O1A2 genotipa, ali bez potvrđene statističke značajnosti (OR 2,33; 95% CI 0,99-5,49), što je uz podatak o veoma maloj učestalosti A2 alela od $0,035 < 0,1$ u hrvatskoj populaciji, rezultat koji nema statistički značaj.

Slični rezultati koji ukazuju na vrlo slabu korelaciju između rizika koronarne arterijske bolesti (CAD) i infarkta miokarda kod nositelja krvne grupe A, dobiveni su u nekim ranijim istraživanjima koja su uključila samo fenotip krvne grupe, dok su tek kasnije studije uključile i ispitivanje genotipa (Allan et al. 1968; Whincup et al. 1990; Akhund et al. 2001;. Waziralli et al. 2005; Roest et al. 2007; Cesena et al. 2006; Wiggins et al. 2009; Carpeggiani et al. 2010). Sada već povijesna studija Allana i suradnika, objavljena još davne 1968. godine, provedena ispitivanjem 353 bolesnika, pokazala je da su bolesnici oboljeli od infarkta miokarda, krvne grupe A bili značajno mlađe dobi u odnosu na ostale oboljele (Allan et al. 1968).

Britanska prospektivna studija Whincupa iz 1990. godine na gotovo 8000 ispitanika iz 24 engleska grada pokazala je da je incidencija ishemičke bolesti srca bila viša također kod

krvne grupe A, u odnosu na druge krvne grupe (Whincup et al. 1990). Istraživanja su se nastavila i u 2001. godini studija iz Pakistana pokazala je da je krvna grupa A fenotipa najčešća kod infarkta miokarda i angine pectoris, a iste bolesti su bile najrjeđe kod osoba krvne grupe O (Akhund et al. 2001). I druga studija iz Pakistana pokazala je da iako je u Pakistanu najučestalija krvna grupa B, najveći broj oboljelih od koronarnih arterijskih bolesti su bolesnici sa krvnom grupom A (Wazirali et al. 2005). S drugog dijela svijeta, iz Brazila studija na 541 pacijentu pokazala je da je A krvna grupa bila povezana sa većim udjelom mlađih pacijenata oboljelih od koronarnih arterijskih bolesti nego druge krvne grupe (Cesena et al. 2006).

Neka istraživanja ističu povećanu prevalenciju alela A i B kod žena poslije menopauze i bolesnika s infarktom miokarda (Roest et al. 2007; Carpeggiani et al. 2010). Roest i suradnici su napravili istraživanje na 89 žena u postmenopauzi koje je pokazalo da su A ili B genotipovi povezani sa 18% višim koncentracijama VWF čimbenika ($P < 0.001$) i sa višom incidencijom akutne ishemične srčane bolesti (relativni rizik 1,8; 95% CI 1,0–3,0).

Novije talijansko istraživanje pokazuje veću prevalenciju alela A i B kod bolesnika s infarktom miokarda (2274 bolesnika praćenih tijekom 10 godina). Zaključili su da grupa B predisponira infarktu miokarda preko genetski promijenjenog koagulacijskog puta, dok A grupa ima važnu ulogu u aterosklerotskoj progresiji okluzije krvne žile. Nešto je veći omjer izgleda za B alele, u usporedbi s A alelima (Carpeggiani et al.2010).

Wiggins i suradnici u istraživanju provedenom 2009. pokazali su da je alel A povezan s infarktom miokarda uz OR 1,23 95% CI(1,05–1,44) (Wiggins et al. 2009).

Nydgger i suradnici zaključili su na temelju svojih rezultata da B alel ABO sustava krvnih grupa predstavlja nezavisni rizični čimbenik za infarkt miokarda jer je kod bolesnika nađena 2,5 puta veća prevalencija B alela, nego u kontrolnij skupini. Dodatno tome, homozigotni nositelji genotipa BB krvne grupe pokazuju najveću razinu čimbenika vWF, za koji je poznato da povećava rizik za infarkta miokarda, jer B antigen sudjeluje u pojačanoj agregaciji trombocita (Nydgger et al. 2003).

Van Beckerath i suradnici navode smanjen rizik za infarkt miokarda kod nositelja alela O1, pri čemu je kod O1O1 alela najveća zaštita od bolesti (Van Beckerath et al. 2004).

Suprotno navedenoj povezanosti s alelima A, B ili s oba alela zajedno, neki autori nisu našli statistički značajnu povezanost između ne-OO krvne grupe i arterijskih oblika kardiovaskularnih bolesti, kao što je infarkt miokarda (Amirzadegan et al. 2006; Sari et al. 2008; Lutfullah et al.2011). Rezultati istraživanja Amirzadegana i suradnika na 2026 bolesnika, nisu pokazali statistički značajnu korelaciju između ABO i arterijskih kardiovaskularnih bolesti, te težine ateroskleroze (Amirzadegan et al. 2006). Turska studija također nije našla povezanost ABO i infarkta miokarda na 476 bolesnika i 203 kontrolna ispitanika (Sari et al. 2008). Nakon dvije pakistanske studije, treća, po obimu najveća studija, nije našla korelaciju između ABO i ishemične srčane bolesti (Lutfullah et al. 2009). Također Penn-Cath studija, Reilly-a i suradnika iz 2011. god. nije dokazala povezanost infarkta miokarda niti s A, niti s B alelom (Reilly et al. 2011).

Kada se uzme u obzir dobro potvrđeni trombotički rizik kod nositelja ne-O krvne grupe i oboljelih od venskih tromboembolija, većina studija koje su ispitivale povezanost ABO krvne grupe i arterijskih bolesti pokazala je nekonzistentne rezultate. Meta-analize tih studija pokazuju nizak OR (OR 1,25; 95% CI 1,14-1,36) za infarkt miokarda, uz OR 1,29 (95% CI 1,16-1,45) za krvnu grupu A, te OR 1,14 za ishemiju mozga arterijskog porijekla (Wu et al. 2008).

Većina retrospektivnih studija pokazala je slabu pozitivnu korelaciju arterijskih bolesti i ne-O krvne grupe (oko 33%) ili s A krvnom grupom 23–29%, dok od 6 prospektivnih studija samo su dvije dokazale da taj rizik uopće postoji (Clark et al. 2011). Veoma je zanimljivo bilo istraživanje Ketcha i suradnika o utjecaju ABO sustava krvne grupe na opseg infarkta i prognozu bolesti. Rezultati navedene studije provedene na 1198 bolesnika pokazali su da bolesnici s ne-O krvnom grupom imaju opsežnije infarkte sa srednjim pikom troponina (33 vs. 24; p = 0.037), ukupnom vrijednošću kreatin kinaze CK (721 vs. 532; p = 0.012) i izoenzima CK-MB (Ketch et al. 2008).

Utjecaj mutacije FV Leiden kod oboljelih od infarkta miokarda ispitivan je u brojnim radovima. Studija Roesta i suradnika, koja je uključivala 89 žena u postmenopauzi nije pokazala da mutacije FVL (1691GA) i FII (20210GA) doprinose riziku za akutnu ishemičku srčanu bolest (Roest et al. 2006).Također rezultati ispitivanja Minana i suradnika ukazuju da kod nositelja ne-O krvne grupe nije povećan rizik od infarkta miokarda kod nositelja FVL ili protrombin G20210A mutacije (Minano et al. 2008). Martini i suradnici nisu

našli povezanost sa FVL ili protrombin G20210A mutacijom, PAI 4G/5G i drugim protrombotičkim genskim polimorfizmima, kao čimbenicima rizika za trombozu kod 1210 pacijenata sa infarktom miokarda mlađe dobi, do 50 god starosti (Martini et al. 2005).

Butt i suradnici ispitivali su povezanost FVL, protrombin G20210A i faktor XIII-A Leu34 sa infarktom miokarda kod 500 bolesnika i 500 kontrolnih ispitanika. Zaključili su da je mutacija protrombin G20210A faktor rizika za infarkt miokarda, a mutacija FVL može predvidjeti ranu epizodu infarkta. Utvrdili su da interakcija dviju mutacija- protrombin i koagulacijskog čimbenika XIII ima sinergistički utjecaj koji predisponira infarktu miokarda (Butt et al. 2003). Grčka studija Rallidisa i suradnika ispitivala je utjecaj mutacija FVL i protrombin G20210A na razvoj infarkta kod 70 bolesnika u dobi ispod 36 godina starosti. Rezultati su pokazali da FVL mutacija ne povećava rizik (OR 0,87 95%CI 0,26-2,5), dok mutacija protrombin G20210A predstavlja faktor rizika za infarkt miokarda kod bolesnika mlađih od 36 godina (OR 4, 95%CI 1,5-11,3) (Rallidis et al. 2003).

Nasuprot ove negativne povezanosti FVL sa infarktom, njemačka studija Middendorfa i suradnika dokazala je da je prevalencija FV Leiden značajno povišena u oboljelih od infarkta miokarda, 8,7% nasuprot 3,7% u kontrolnoj skupini, OR 2,46 (95% CI 1,35-4,50). Pacijenti s FVL imaju predispoziciju za infarkt miokarda u mlađoj dobi. Navodi se da je povezanost veća kod bolesnika mlađe dobi zbog toga što je kod njih veći utjecaj genetskog naslijeđa, a manji aterosklerotičkih ili sekundarnih okolišnih faktora. Treba naglasiti da je kod mlađih osoba prisutan dodatni sinergizam s okolišnim čimbenicima poput pušenja i uzimanja oralnih kontraceptiva, pa određivanje protrombotičkih mutacija treba uzeti u razmatranje za mlađu populaciju i pedijatrijske slučajeve (Middendorf et al. 2004).

Iako se u literaturi navodi da više prokoagulantnih čimbenika zajedno povećava trombotički rizik, tursko ispitivanje trombofilije kod mladih pacijenata s akutnim infarktom miokarda u dobi ispod 45 godina nije utvrdilo povezanost između FVL, protrombin G20210A i MTHFR C677T, protein C, protein S i AT III deficita i kardiovaskularnih bolesti kod mlađe populacije. Ovo je i jedna od rijetkih studija koje su između ostalog ispitale utjecaj mutacije u genu za metilentetrahidrofolat reduktazu na razvoj infarkta miokarda i rizični utjecaj nije dokazan (Celik et al. 2008).

Meta-analize također pokazuju veoma malu povezanost između FVL, G20210A FII mutacija i arterijskih bolesti. Tri meta analize ispitivale su vezu mutacije FVL i infarkta miokarda. Copenhagen city heart studija nije našla povezanost (Juul et al. 2002). Butt i suradnici našli su slične prevalencije između bolesnika i kontrolnih ispitanika, ali FVL je nađen u 13% bolesnika s infarktom miokarda mlađe dobi. Middendorf i suradnici također su naveli raniju incidenciju infarkta miokarda za nositelje FV Leiden mutacije. Navodi se kritički osvrt na neslaganje između rezultata pojedinih studija, koje može biti uslijed manjkavih kriterija odabira sudionika ispitivanja, genetičke pozadine studirane populacije, nedovoljno promišljene interakcije s okolišnim čimbenicima rizika i upitne statističke snage studije (De Moerloose, 2007). Rezultati meta studije Kima i Beckera pokazuju skroman utjecaj FVL (OR 1,21 95% CI 0,99-1,49), protrombina G20210A (OR 1,32, 95%CI 1,03-1,69), a MTHFR TT (OR 1,20 95%CI 1,02-1,41). Bolesnici mlađi od 55 godina i žene pokazali su nešto jače povezanosti (Kim et al. 2003). Meta analiza sedam hemostatskih genskih polimorfizama u koronarnoj bolesti (svaki polimorfizam ispitan na 5000 slučajeva koronarne bolesti i 5000 kontrolnih ispitanika) utvrdila je za dvije mutacije koje povećavaju stvaranje cirkulirajućeg trombina, slabu povezanost sa kardiovaskularnim bolestima, uz relativne rizike za FVL 1,17 95% CI 1,08-1,28, te za protrombin G20210A, RR 1,31 95% CI 1,12-1,52 (Ye et al. 2006).

Sumarno, neke studije navode veću povezanost infarkta miokarda s mutacijom Faktor V Leiden (Middendorf et al. 2004), a druge s mutacijom protrombin G20210A(Rallidis et al. 2003; Butt et al. 2003), dok meta analize pokazuju skromnu povezanost obje navedene mutacije s arterijskim bolestima, kao i s infarktom miokarda (de Moerloose et al. 2007; Kim et al. 2003; Ye et al. 2006). Uglavnom je povezanost veća kod bolesnika mlađe dobi i češće kod žena (Kim et al. 2003).

Iako teoretski svi rizici koji doprinose nastanku tromba mogu povećati incidenciju infarkta miokarda, rezultati naše studije ne govore u prilog tome. Rezultati provedene studije sugeriraju da ispitani genetički protrombotički čimbenici (FV Leiden, protrombin G20210A i MTHFR677 TT) ne doprinose značajno razvoju infarkta miokarda. Općenito ima malo studija koje su se bavile istraživanjem povezanosti MTHFR C677T mutacije i infarkta miokarda, ali i one koje su rađene, nisu potvrdile njihovu povezanost, baš kao i u našoj studiji (Celik et al. 2008).

χ^2 testom se utvrđuje da nema statistički značajne razlike između spolova kod pojave akutnog infarkta OR 1,17, 95% CI (0,80-1,71), na razini p=0,466. Značajan čimbenik rizika za infarkt miokarda predstavlja dob, pa osobe starije od 55 godina imaju više od 17 puta veći rizik (OR 17,6 uz 95% CI: 10,99-27,71). Međutim, unutar skupine bolesnika nema statistički značajne razlike u pojavnosti infarkta miokarda između muškaraca i žena s obzirom na dob.

Tako rezultati našeg rada nisu dokazali da nositelji ne-O krvne grupe, kao niti protrombotičkih čimbenika imaju povećani rizik za razvoj infarkta miokarda. Prema usporedbama, jedino je starija dob značajan faktor rizika za pojavu infarkta miokarda. Ograničenje našeg ispitivanja je što nismo ispitali dodatne okolišne čimbenike rizika, poput pušenja, hipertenzije, tjelesnog indeksa mase, tjelesne aktivnosti, hiperlipidemije, koji se ubrajaju u modificirajuće faktore rizika. Međutim, ispitanici obuhvaćeni studijom su etnički homogeni, bolesnici su odabrani prema potvrđenoj dijagnozi, a varijante genetičkih protrombotičkih faktora u Hrvatskoj ne odstupaju značajno, u odnosu na ostale europske narode. S obzirom da je infarkt miokarda multifaktorijalna bolest, vjerojatno jako puno čimbenika sinergistički utječe na razvoj bolesti sa skromnijim intenzitetima.

Arterijske i venske tromboembolije u podlozi bolesti imaju brojne zajedničke rizične čimbenike, koji ujedno mogu biti i biljezi rizika. S obzirom da se radi o veoma kompleksnim bolestima u čiji je razvoj uključeno puno gena, genskih mehanizama, različitih kontrolnih sustava ekspresije koji mogu pojačavati ili utišavati gene, kao i sekundarnih čimbenika iz okoliša, da bi se dobila cjelovita slika, treba istraživati postepeno, dio po dio rizičnih čimbenika genetskih i sekundarnih i njihovih utjecaja, te sve složiti u mozaik.

S obzirom da je u većini studija utvrđen trombotički rizik kod oboljelih nositelja ne-OO krvne grupe s venskim tromboembolijama i skroman utjecaj ABO sustava na arterijske vaskularne bolesti, postavljaju se pitanja o razlozima i uvjetovanosti te povezanosti. Poznato je da su važni biljezi rizika za tromboembolije čimbenici koji sudjeluju u stvaranju i progresiji ugruška. Bolesnici s ne-O KG imaju za 25-30% više vrijednosti von Willebrandovog čimbenika (vWF) u plazmi, nego osobe s krvnom grupom O. Iako se smatra da je to posljedica izravnog funkcionalnog utjecaja ABO genskog lokusa, mehanizam nije razjašnjen.

Razina vWF značajno varira unutar osobe i između osoba, što se povezuje s ABO krvnom grupom, dobi i stresom. Pokazalo se da osobe koje nose jedan O alel imaju značajno nižu vrijednost vWF/ F VIII u plazmi, nego genotipovi bez O alela. To se objašnjava teorijom da osobe s genotipom OO nemaju enzime glikoziltransferaze koje mogu prevesti antigen H u A ili B, pa imaju povećanu ekspresiju H antigena (Sousa et al. 2007). Čimbenik vWF posreduje u adheziji trombocita, agregaciji, stoga bolesnici s ne-O krvnom grupom imaju povećan trombotički rizik i češće su zastupljeni u skupini bolesnika s tromboembolijama, posebice venskim.

Poznato je da ABO krvna grupa izravno određuje plazmatsku razinu obadva koagulacijska glikoproteina vWF/FVIII (Wu et al. 2008). Smatra se da ABO krvna grupa može mijenjati brzinu sinteze vWF ili njegove sekrecije unutar stanica endotela. Trombociti mogu vezati vWF preko najmanje 2 receptora, preko glikoproteina Ib-IX-V na A1 domenu vWF, a preko glikoproteina IIb/IIIa na C1 domenu. Dodatno, uz ABO krvno-grupni status, vrijednosti vWF su pod utjecajem različitih stanja koja predisponiraju kardiovaskularnim bolestima, kao što su dijabetes, metabolički sindrom i kronična upalna stanja (Ketch et al, 2008). Navodi se da na razinu vWF utječe i stil života, okolišni faktori i pušenje (van Schie et al. 2010).

S obzirom da povišeni vWF ukazuje na povećani rizik za kardiovaskularni događaj, ispitivanje djelovanja vWF i njegove interakcije sa trombocitima i kolagenom, čini se atraktivnim ciljem za nove anti-trombotičke terapije (Ketch et al. 2008).

Čini se da je povezanost genotipa ABO s arterijskim i venskim trombozama uvjetovana djelomično preko vWF koji nosi F VIII koagulacije i štiti ga od razgradnje. Smatra se da utjecaj ABO genotipova na vWF/F VIII omogućuje prisustvo antigena A, B i H(O) na samom čimbeniku vWF. Pretpostavka je također da A, B, H(O) antigeni imaju utjecaj na klirens vWF, ali mehanizam toga još nije poznat (Wiggins et al. 2009).

Još 1990. Buolton i suradnici su naveli da vrijednost koagulacijskog F VIII u plazmi određuju značajno ABO krvne grupe, pa osobe s A ili B imaju u prosjeku za 8% više F VIII, u odnosu na O krvnu grupu. Kako su ABO antigeni oligosaharidi raspoređeni u svim tkivima, te A i B antigeni imaju jednu dodatnu podjedinicu u odnosu na O krvnu grupu, smatrali su da je mehanizam sinteze oligosaharida nekako povezan sa sintezom ili sekrecijom koagulacijskog FVIII ili nekako utječe na njegovu glikozilaciju (Boulton et al. 1990).

Najnovija studija Van Schie i suradnika dokazuje također da je ABO krvna grupa najvažnija genska odrednica razine čimbenika vWF, ali i SNP-ovi unutar vWF gena. N-vezani ugljikohidratni lanci na molekuli vWF sadrže antigene A i B krvnih grupa, koji su kodirani ABO genima na 9. kromosomu. Ti antigeni smanjuju klirens vWF, pa osobe s ne-O KG imaju povišene vrijednosti vWF. Povezanost porasta razine vWF s dobi objašnjava se povećanom rigidnošću arterija tijekom starenja. Metaloproteinaza ADAMTS-13 i trombospondin TSP-1 su regulatori multimernog oblika vWF, koji je važan za kontrolu stvaranja tromba, što može utjecati na rizik za trombozu. U novije vrijeme za studije otkrivanja genskih lokusa koji sadrže gene koji doprinose bolesti koriste se *genome wide association* studije (GWAS). GWAS studije su pokazale da sniženi ADAMTS-13, uz povećani vWF dovodi do povećanog rizika za infarkt miokarda i inzult. Također se kao odrednica vrijednosti vWF u plazmi navode i SNARE proteini odgovorni za sekrecijska stanična zbivanja, a TSP-1 je uključen u upalu i trombozu djelujući na stabilizaciju tromba (van Schie et al. 2010).

Osim toga poznato je da su oligosaharidni antigeni A i B vezani na prekursore proteina i lipida, te stoga mogu biti pod utjecajem kolesterola i drugih lipida stanične membrane. Još 1987. godine, američka istraživanja pokazala su povezanost A antigena sa povećanjem ukupnog serumskog kolesterola i LDL kolesterola (George et al. 1987). Sličnu povezanost između hiperlipoproteinemije i krvne grupe A su potvrdile i njemačka studija provedena na novorođenčadi i njihovim roditeljima (Kipshidse et al. 1989), te japanska studija koja je potvrdila korelaciju između razine kolesterola i krvne grupe A (Wong et al. 1992). Novije GWAS istraživanje Teupsera i suradnika dokazalo je jaku povezanost ABO lokusa sa vrijednostima fitosterola iz biljaka koji se unose hranom, a predstavljaju biljeg unosa kolesterola (Teupser et al. 2010).

Rezultati našeg ranijeg istraživanja kombinirane skupine 154 bolesnika s arterijskim trombozama, venskim trombozama i tromboflebitisom i 200 asimptomatskih davatelja krvi pokazali su najveću povezanost za genotipove A1B/A2B (OR, 2,73; 95% CI, 1,10- 6,74), slijedili su BB/O1B/O2B (OR, 2,29; 95% CI, 1,25-4,21) i na kraju O1A1/O2A1 (OR, 1,95; 95% CI, 1,15-3,31). Mutacija FV Leiden povećala je trombotički rizik za 31 put u skupini nositelja OO, a četiri puta u skupini ne-OO genotipova (Jukić et al. 2009).

U meta analizi načinjenoj ove godine Dentali i suradnici pokazali su skupni OR za ABO i VTE od 2,09, te su zaključili da je ne-O krvna grupa kandidat da postane jedan od najvažnijih čimbenika rizika za venske tromboze (Dentali et al. 2012).

Rezultati dvije velike prospektivne studije ispitivanja povezanosti ABO krvne grupe i rizika za kardiovaskularne bolesti na 62 073 žena i 27 428 muškaraca u SAD, pokazali su da je ne-O krvna grupa značajno povezana s povećanim rizikom za kardiovaskularne bolesti. Rizik se dovodi u vezu s povišenim vrijednostima vWF/ F VIII, lipida i upalnih biljega. Najveći rizik je utvrđen kod krvne grupe AB, pa slijede krvne grupe B i A (He et al. 2012).

Glavni zaključak ovog rada je da je utvrđen povećani trombotički rizik kod ne-OO nositelja u odnosu na OO nositelje genotipova ABO krvne grupe za razvoj tromboembolijskih bolesti koji iznosi OR 1,46; 95% CI : 1,06 – 2,02; $p<0,05$. Rizik od venske tromboembolije kod ne-OO KG statistički je još značajniji (OR 1,68; 95% CI : 1,12 – 2,53), a suprotno tome kod arterijskih tromboembolija nije utvrđena statistički značajna razlika u pogledu trombotičkog rizika između ne-OO i OO- nositelja ABO krvne grupe.

Statističkom obradom utvrđen je veći rizik za obolijevanje od tromboembolijskih bolesti kod nositelja genotipova O1B/O2B/BB i AB/ A2B tj. nositelja A i B alela. Za taj veći rizik prvenstveno je odgovoran alel B. Njegova pojavnost je testiranjem razlike proporcije statistički zbačajno veća u skupini bolesnika sa venskom tromboembolijom (0,16) nego u kontrolnoj (0,11). Kod oboljelih od infarkta miokarda niti jedan ne-OO genotip ne povećava trombotički rizik, niti su zabilježene statistički značajne razlike u frekvenciji alela u odnosu na kontrolnu skupinu.

Mutacija FVL u skupini ne-OO nositelja povećava izglede za razvoj venske tromboze oko 9 puta, za nositelje MTHFR 677TT povećava ga oko 4 puta, dok mutacija FII G20210A kod ne-OO nositelja nema značenje kao čimbenik rizika. Protrombotički genetički čimbenici niti u jednoj skupini ne doprinose povećanju rizika za razvoj akutnog infarkta miokarda. Incidencija tromboembolijskih bolesti kod žena statistički je značajno veća u odnosu na muškarce uz OR 1,43, a izgledi su još veći za razvoj venske tromboze kod žena za 2,53 puta u odnosu na muškarce. Suprotno tome, nema statistički značajne razlike između spolova za pojavu akutnog infarkta. Dob je značajan čimbenik za razvoj infarkta miokarda kod osoba starijih od 55 godina (17,6 puta veći rizik).

Bitno je naglasiti na kraju da su ugljikohidratni antigeni koji su dijelovi ABO sustava krvnih grupa blisko srodni antigenima u bakterijama, biljkama i životinjama. To je dokaz konzervacije i očuvanja gena ABO tijekom evolucije i odražava važnost sustava ABO(H) antigena u svakodnevnom životu i, naravno, pri transfuziji krvi.

Proučavanje fiziologije i uloge glikanskih struktura čimbenika vWF trebalo bi također pomoći u razumijevanju mehanizama kojima krvne grupe doprinose trombotičkom riziku.

Osim što utječe kao sustav antigena na povezanost s bolestima, ABO sustav očigledno vrši još neke važne funkcije i nastaviti će i dalje pobuđivati zanimanje znanstvenika koji se bave glikobiologijom, a posebice transfuziologa.

6. ZAKLJUČCI

1. Povećani trombotički rizik kod ne-OO nositelja u odnosu na OO nositelje genotipova ABO krvne grupe za razvoj tromboembolijskih bolesti iznosi **OR 1,46**; 95% CI : 1,06 – 2,02; p<0,05. Rizik od venskih tromboembolija kod ne-OO KG statistički je još značajniji (**OR 1,68**; 95% CI: 1,12 – 2,53), a suprotno tome kod arterijskih tromboembolija nema statistički značajne razlike u pogledu trombotičkog rizika između ne-OO i OO-nositelja ABO krvne grupe.

2. Testiranje razlike proporcije frekvencija 5 osnovnih alela u kontrolnoj skupini (O1 – 0,63; O2 – 0,025; A1- 0,21; A2 – 0,035; B – 0,11) i skupini svih bolesnika sa tromboembolijama (O1 – 0,57; O2 – 0,03; A1 – 0,023; A2 – 0,04; B – 0,13) ukazuje da ne postoji statistički značajna razlika. Pojavnost O1 alela u kontrolnoj skupini (O1-0,63) je statistički značajno veća u odnosu na skupinu s venskom trombozom (O1-0,54), dok je pojavnost B alela statistički značajno veća u skupini s venskom trombozom (0,16) u odnosu na kontrolnu skupinu (0,11), P<0,05.

3. Statističkom obradom utvrđen je veći rizik za obolijevanje od tromboembolijskih bolesti kod nositelja genotipova O1B/O2B/BB i AB/ A2B koji imaju povećanu predispoziciju za venske tromboembolije od nositelja O alela. Kod infarkta miokarda niti jedan ne-OO genotip ne povećava trombotički rizik.

4. Mutacija FVL u skupini ne-OO nositelja povećava izglede za razvoj venske tromboze oko 9 puta, za nositelje MTHFR 677TT povećava ga oko 4 puta, dok mutacija FII G20210A kod ne-OO nositelja nema značenje kao čimbenik rizika. Protrombotički genetički čimbenici niti u jednoj skupini ne doprinose povećanju rizika za razvoj akutnog infarkta.

5. Incidencija tromboembolijskih bolesti kod žena statistički je značajno veća u odnosu na muškarce uz OR 1,43 , a izgledi su još veći za razvoj VTE kod žena, za 2,53 puta veći u odnosu na muškarce. Suprotno tome, nema statistički značajne razlike između spolova za pojavu akutnog infarkta.

6. Dob je značajan čimbenik za razvoj infarkta miokarda kod osoba starijih od 55 godina (17,6 puta veći rizik).

7. LITERATURA

Akhund IA, Alvi IA, Ansari AK (2001) A study of relationship of ABO blood groups with myocardial infarction and angina pectoris. *J Ayub Med Coll Abbottabad* **13**: 25-26

Allan TM, Dawson AA (1968) ABO blood groups and ischaemic heart disease in men. *Br Heart J* **30**: 377-382

Almawi WY, Tamim H, Kreidi R, Timson G, Rahal E, Nabulsi M (2005) A case control study on the contribution of factor V-Leiden, prothrombin G20210A and MTHFR C677T mutations to the genetic susceptibility of deep venous thrombosis. *J Thromb Trombolys* **19**: 189-196

Altman DG, Bland JM (1995) Statistics notes: the normal distribution. *BMJ* **310**: 298

Amirzadegan A, Salarifar M, Sadeghian S (2006) Correlation between ABO blood groups, major risk factors and coronary artery disease. *Int J Cardiol* **110**: 256-258

Anderson FA Jr, Spencer FA (2003) Risk factors for venous thromboembolism. *Circulation* **107** : I-9-16

Anstee DJ (2005) Goodbye to agglutination and all that? *Transfusion* **45**: 652-653

Anstee DJ (2009) Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood* **114 2**:248-256

Baglin T, Luddington R, Brown K, Baglin C (2003) Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study. *Lancet* **362:** 523-526

Baker WF Jr (1998) Diagnosis of deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Med Clin North Am* **82**: 459-476

Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. (1994) Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* **369**: 64-67

Bertina RM, Vos Hans L (2011) A Novel Genetic Risk Factor for Venous Thrombosis. *Clin Chem* **57:** 637-638

Bezemer ID, Rosendaal FR (2007) Predictive genetic variants for venous thrombosis: what's new? *Semin Hematol* **44**: 85-92

Biswas J, Islam MA, Rudra S, Haque MA, Bhuiyan ZR, Husain M, Mamun AA (2008) Relationship between blood groups and coronary artery disease. *Mymensingh Med J.* **17**(2 Suppl): S22-27

Blackwell CC, Dundas S, James VS, et al. (2002) Blood group and susceptibility to disease caused by Escherichia coli O157. *J Infect Dis* **185**: 393-396

Bloodbook.com.(2008) Racial and ethnic distribution of ABO blood types http://www.bloodbook.com/world-abo.html. *pristupljeno 2010-08-01*

Blood group antigen mutation database, (BGMUT) *podaci na internet bazi, pristupljeno 2009-03-06*

Blumenfeld OO, Patnaik SK (2004) Allelic genes of blood group antigens: a source of human mutations and cSNPs documented in the Blood Group Antigen Gene Mutation Database *Hum Mutat* **23**: 8–16

Boulton FE (1990) ABO blood group and ischaemic heart disease. *BMJ* **4**: 290-295

Brækkan SK, Mathiesen EB, Njølstad I, Wilsgaard T, Hansen J-B (2010) Hematocrit and risk of venous thromboembolism in general population. The Tromsø Study. Haematologica. **95:** 270-275

Burton NM, Anstee DJ (2008) Structure, function and significance of Rh proteins in red cells. *Curr Opin Hematol* **15**: 625-630

Butt C, Zheng H, Randell E (2003) Combined carrier status of prothrombin 20210A and factor XIII-A Leu34 alleles as a strong risk factor for myocardial infarction: evidence of a gene-gene interaction. *Blood* **15**: 3037-3041

Calafell F, Bertranpetit J, Ramírez-Soriano A, Saitou N, Blancher A, Roubinet F (2008) Evolutionary dynamics of the human ABO gene. *Hum Genet* **124**: 123–135

Carpeggiani C, Coceani M, Landi P (2010) ABO blood group alleles: A risk factor for coronary artery disease. An angiographic study. *Atherosclerosis* **211**: 461-466

Celik M, Altintas A, Celik Y (2008) Thrombophilia in young patients with acute myocardial infarction. *Saudi Med J* **29**: 48-54

Cesena FH, da Luz PL (2006) ABO blood group and precocity of coronary artery disease. *Thromb Res* **117:** 401-402

Clark P, Wu O (2011) ABO blood groups and thrombosis: a causal association, but is there value in screening? *Future Cardiol* **7**: 191-201

Costantini M, Fassio T, Canobbio L (1990) Role of blood groups as prognostic factors in primary breast cancer. *Oncology* **47**: 308-312

Cserti CM, Dzik WH (2007) The ABO blood group system and Plasmodium falciparum malaria. *Blood* **110**: 2250-2258

Dahlback B (1995) Resistance to activated protein C, the Args06 to Gln mutation in the factor V gene, and venous thrombosis. *Thrombos Haemostas* **73**: 739-742

Daniels G (2002) *Human blood groups*. Blackwell Science Oxford.

Daniels G (2005) The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transpl Immunol* **14** : 143–153

Daniels G (2009) The molecular genetics of blood group polymorphism. *Hum Genet* **126**: 729-742

Dean L (2005) *Blood Groups and Red Cell Antigens*. Chapter 5: The ABO blood group. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information.

De Moerloose P, Boehlen F (2007) Inherited thrombophilia in arterial disease: a selective review. *Semin Hematol* **44**: 106-113

Den Heijer M, Lewington S, Clarke R (2005) Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost* **3**: 292-299

Dentali F, Sironi AP, Ageno W, Turato S, Bonfanti C, Frattini F, Crestani S, Franchini M (2012) Non-O blood type is the commonest genetic risk factor for VTE: results from a meta-analysis of the literature. *Semin Thromb Hemost* **38**: 535-548

De Stefano V, Leone G (1995) Resistance to activated protein C due to mutated factor V as a novel cause of inherited thrombophilia. *Haematologica* **80**: 344–356

De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni K, Leone G (1998) Epidemiology of factor V Leiden: clinical implications. *Semin Thromb Hemost* **24**: 367–379

De Stefano V, Martinelli I, Mannucci P (2001) The risk of recurrent deep venous thromboembolism among heterozygous carriers of the G20210A prothrombin gene mutation. *Br J Hematol* **113**: 630–635

Edgren G, Hjalgrim H, Hjalgrim H, Reilly M, Tran TN, Rostgaard K , Rostgaard K, Shanwell A (2007) Risk of cancer after blood transfusion from donors with subclinical cancer: a retrospective cohort study. *Lancet* **369**: 1724–1730

Edgren G, Hjalgrim H, Rostgaard K, Norda R, Wikman A, Melbye M, Nyrén O (2010) Risk of Gastric Cancer and Peptic Ulcers in Relation to ABO Blood Type: A Cohort Study. *Am J Epidemiol* **172**: 1280-1285

Franchini M**,** Capra F**,** Targher G (2007) Relationship between ABO blood group and von Willebrand factor levels: from biology to clinical implications. *Thromb J* **5**:14:1-5

Franchini M, Favaloro EJ, Targher G, Lippi G (2012) ABO blood group, hypercoagulability, and cardiovascular and cancer risk. *Crit Rev Clin Lab Sci* **49**: 137-149

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozen R (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* **10**: 111-113

Garratty G (1995) Blood group antigens as tumor markers, parasitic/bacterial/viral receptors, and their association with immunologically important proteins. *Immunol Invest* **24**: 213-232

Garratty G (2000) Blood groups and disease: a historical perspective. *Transfus Med Rev* **14**: 291-301

Garratty G, Glynn SA, McEntire R (2004) ABO and Rh(D) phenotype frequencies of different racial/ethnic groups in the United States. *Transfusion* **44**: 703-706

Garraty G (2005) Relationship of blood groups to disease: do blood group antigens have a biological role? *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* **43**: 113-121

Gassner C, Schmard A, Nussbaumer W, Schönitzer D (1996) ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Blood* **88**: 1852-1856

George VT, Elston RC, Amos CI, Ward LJ, Berenson GS (1987) Association between polymorphic blood markers and risk factors for cardiovascular disease in a large pedigree. *Genet Epidemiol* **4**: 267-275

Gonzalez-Campora R, Garcia-Sanatana JA (1998) Blood group antigens in differentiated thyroid neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* **122**: 957-965

Gonzalez Ordonez AJ, Medina Rodriguez JM, Martin L, Alvarez V, Coto E (1999) The ABO blood group protects against venous thromboembolism in individuals with the factor V Leiden but not the prothrombin (factor II G20210A) mutation. *Blood Coagul Fibrinol* **10**: 303-307

Greenwalt TJ (1997) A short history of transfusion medicine. *Transfusion* **37**: 550-562

Hakomori S (1999) Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta* **1473**: 247-266

He M, Wolpin B, Rexrode K, Manson JE, Rimm E, Hu FB, Qi L (2012) ABO blood group and risk of coronary heart disease in two prospective cohort studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**: 2314-2320

Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2010) Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2009. godinu. www.hzjz.hr/publikacije/hzs.../Ljetopis_Yearbook_HR_2010.pdf

Iodice S, Maisonneuve P, Botteri E, Sandri MT (2010) ABO blood group and cancer. *Eur J Cancer* **46**: 3345-3350

Issitt PD, Anstee DJ (1998) *Applied blood Group Serology*. Montgomery Scientific Publications.

Jaff MS (2010) Higher frequency of secretor phenotype in O blood group - its benefits in prevention and/or treatment of some diseases. *Int J Nanomedicine* **2**: 901-905

Janardhana V, Propert DN, Green RE (1991) ABO blood groups in hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* **51**: 113-120

Jenkins PV, O'Donnell JS (2006) ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all? *Transfusion* **46**: 1836-1844

Jick H, Slone D, Westerholm B, Inman WH, Vessey MP, Shapiro S, Lewis GP, Worcester J (1969) Venous thromboembolic disease and ABO blood type. A cooperative study. *Lancet* **1**: 539-542

Jukic I, Bingulac-Popovic J, Dogić V, *et al*. (2009) ABO blood groups and genetic risk factors for thrombosis in Croatian population. *Croatian Med J* **50**: 550-558

Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Kofoed S, Jensen G, Nirdestgaard BG (2002) Factor V Leiden:The Copenhagen City hearth study and 2 meta-analyses. *Blood* **100:** 3-10

Kamlesh G, Hardeep PS, Harpreet K, Vasudha S (2005) ABO Blood Groups in Gastrointestinal Tract (GIT) and Breast Carcinoma Patients. *Anthropologist* **7**: 189-192

Ketch TR, Turner SJ, Sacrinty MT, Lingle KC, Applegate RJ, Kutcher MA, Sane DC (2008) Derived fibrinogen compared with C-reactive protein and brain natriuretic peptide for predicting events after myocardial infarction and coronary stenting. *Am Heart J* **156**: 234-240

Ketch TR, Turner SJ, Sacrinty MT, Lingle KC, Applegate RJ, Kutcher MA, Sane DC (2008) ABO blood types: influence on infarct size, procedural characteristics and prognosis. *Thromb Res* **123**: 200-205

Kim RJ, Becker RC (2003) Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J* **146**: 948-957

Kipshidse NN, Schawgulidse NA (1989) Arteriosclerosis and blood lipids. *Z Gesamte Inn Med* **44:** 175-176

Klein HG (2007) Why Do People Have Different Blood Types? *Scientific American pristupljeno* 2007-11-16.

Kominato Y, Hata Y, Matsui K, Takizawa H (2005) Regulation of ABO expression. *Leg Med* **7**: 263-265

Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V *et al*. (1996) Inherited thrombophilia: part I. *Thromb Haemost* **76**: 651–662

Lane DA, Grant PJ (2000) Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* **95**: 1517-1532

Larsen T, Johnsen S, Gislum M, Moller A, Larsen H, Sorensen H (2005) ABO blood groups and risk of venous thromboembolism during pregnancy and the puerperium. A population-based, nested casecontrol study. *J Thromb Haemost* **3**: 300–304

Li Q, Yu CH, Yu JH, Liu L, Xie SS, Li WW, Yang X, Fan WB, Gai ZT, Chen SJ, Kato N (2012) ABO blood group and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in patients with chronic hepatitis B. *PLoS One* **7**: e29928

Lutfullah L, Bhatti TA, Hanif A, *et al*. (2011) ABO blood group distribution and ischaemic heart disease. Ann King Edward Med Univ **17**:1

Maisonneuve P, Iodice S, Löhr JM, Lowenfels AB (2009) ABO Blood Group and the Risk of Pancreatic Cancer, *JNCI J Natl Cancer Inst* **101**: 1156

Makoto N, Keitaro M, Hidemi I, Kohei S, Satoyo H, Watanabe M, Seiji I, Sawaki A, Shinsuke I, Shigeki S, Yasushi Y *et al*. (2011) ABO Genotype and the Risk of Gastric Cancer, Atrophic Gastritis, and Helicobacter pylori infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**: 1665-1672

Mallinson T (2010) Myocardial Infarction Focus on First Aid (15): 15. *pristupljeno* 2010-06-08

Marinaccio M, Traversa A, Carioggia E *et al*. (1995) Blood groups of the ABO system and survival rate in gynecologic tumors. *Minerva Ginecol* **47**: 69-76

Martinelli I (2006) Thromboembolism in women. *Semin Thromb Hemost* **32**: 709-711

Martini CH, Doggen CJ, Cavallini C, *et al*. (2005) No effect of polymorphisms in prothrombotic genes on the risk of myocardial infarction in young adults without cardiovascular risk factors. *J Thromb Haemost* **3**: 177-179

Matýsková M, Zavrelová J, Pejchalová A, Meluzinová H, Janků L (2002) ABO/H blood groups and factor V Leiden. *Cas Lek Cesk* **141**: 146-151

McSweeney JC, Cody M, O'Sullivan P, Elberson K, Moser DK, Garvin BJ (2003) Women's early warning symptoms of acute myocardial infarction. *Circulation* **108**: 2619–2623

Mehrazin M (2006) ABO blood group frequency and brain tumors. *Asian Pac J Cancer Prev* **7**: 582-584

Metoki R, Kakudo K, Tsuji Y, et al. (1989) Deletion of histo-blood group A and B antigens and expression of incompatible A antigen in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* **81**: 1151-1157

Middendorf K, Göhring P, Huehns TY et al. (2004) Prevalence of resistance against activated protein C resulting from factor V Leiden is significantly increased in myocardial infarction: investigation of 507 patients with myocardial infarction. *Am Heart J* **147**: 897-904

Minano A, Ordonez A, Espana F, et al. (2008) AB0 blood group and risk of venous or arterial thrombosis in carriers of factor V Leiden or prothrombin G20210A polymorphisms. Haematologica **93**: 729-34

Mitchell JR (1977) An association between ABO blood-group distribution and geographical differences in death-rates. *Lancet* **5**: 295-297

Mohandas N, Narla A (2005) Blood group antigens in health and disease. *Curr Opin Hematol* **12**: 135–117

Morelli WM, De Visser MCH, Vos HL, Bertina RM, Rosendaal FR (2005) ABO blood group genotypes and the risk of venous thrombosis: effect of factor V Leiden. *J Thromb Haemost* **3**: 183-185

Nayak SK (1997) ABO blood groups in different diseases. *J Ind Med* **87**: 449-452

Nydgger UE, Wuillemin WA, Julmy F et al. (2003) Association of ABO histo-blood group B allele with myocardial infarction. *Eur J Immunogenet* **30**: 201-206

Ohira T, Cushman M, Tsai MY, Zhang Y, Heckbert SR, Zakai NA, *et al* (2007) ABO blood group, other risk factors and incidence of venous thromboembolism: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). *J Thromb Haemost* **5**: 1455-1461

Okada Y, Arima T, Togawa K, Nagashima H, Jinno K, Moriwaki S, Kunitomo T, Thurin J, Koprowski H (1987) Neoexpression of ABH and Lewis blood group antigens in human hepatocellular carcinomas. *J Natl Cancer Inst* **78**: 19-28

Orlow I, Lacombe L, Pellicer I, et al. (1998) Genotypic and phenotypic characterization of the histoblood group ABO(H) in primary bladder tumors. *Int J Cancer* **75**: 819-824

Petrovečki M, Bilić-Zulle L (2010) *Statistička obradba podataka u biomedicinskim istraživanjima*. Medicinska naklada.

Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM (1996) A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* **88**: 3698-3703

Potts, WTW (1979) *History and Blood Groups in the British Isles.* St. Martin's Press.

Procare-GEHT group (2006) ABO blood group but not haemostasis genetic polymorphisms significantly influence thrombotic risk: a study of 180 homozygotes for the factor V Leiden mutation. *Br J Haematol* **135**: 697-702

Rallidis LS, Belesi CI, Manioudaki HS *et al*.(2003) Myocardial infarction under the age of 36: prevalence of thrombophilic disorders. *Thromb Haemost* **90**: 272-278

Reid ME, Mohandas N (2004) Red blood cell blood group antigens: structure and function. *Semin hematol* **41**: 93–117

Reilly MP, Li M, He J, Ferguson JF, Stylianou IM, Mehta NN, Burnett MS, Devaney JM, Knouff CW, Thompson JR, Horne BD, Stewart AF, Assimes TL, Wild PS, Allayee H, Nitschke PL, Patel RS, Martinelli N, Girelli D, Quyyumi AA, Anderson JL, Erdmann J, Hall AS, Schunkert H, Quertermous T, Blankenberg S, Hazen SL, Roberts R, Kathiresan S, Samani NJ, Epstein SE, Rader DJ (2011) Identification of ADAMTS7 as a novel locus for coronary atherosclerosis and association of ABO with myocardial infarction in the presence of coronary atherosclerosis: two genome-wide association studies. *Lancet* **377**: 383–392

Reiner AP, Siscovick DS, Rosendaal FR (2001) Haemostatic risk factors and arterial thrombotic disease. *Thromb Haemost* **85**: 584-595

Robert A, Aillaud MF, Eschwege V, Randrianjohany A, Scarabin Y, Juhan-Vague I (2000) ABO blood group and risk of venous thrombosis in heterozygous carriers of factor V Leiden. *Thromb Haemost* **83**: 630–631

Rodger MA, Paidas M, McLintock C et al. (2008) Inherited thrombophilia and pregnancy complications revisited. *Obstet Gynecol* **112**: 320–324

Roest M, Voorbij HA, Barendrecht AD *et al*. (2007) Risk of acute ischemic heart disease in postmenopausal women depends on von Willebrand factor and fibrinogen concentrations, and blood group genotype. *J Thromb Haemost* **5**: 189-191

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. (2012) Executive summary: heart disease and stroke statistics - 2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **125**: 188–197

Romodanov SA, Gnedkova IA, Lisianyi NI, Glavatskii A (1989) Efficacy of chemotherapy and immunochemotherapy in neuro-oncologic patients of various blood groups. *Zh Vopr Neirokhir Im N N Burdenko* **1**: 17-20

Rosendaal F, Vessey M, Rumley A et al. (2002) Hormonal replacement therapy, prothrombotic mutations and the risk of venous thrombosis. *Br J Hematol* **16**: 851–854

Ross R (1999) Atherosclerosis — an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**: 115–126

Roots I, Drakoulis N, Ploch M, et al (1988**)** Debrisoquine hydroxylation phenotype, acetylation phenotype, and ABO blood groups as genetic host factors of lung cancer risk. *Klin Wochenschr*; **66**: 87-97

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Sari I, Ozer O, Davutoglu V, Gorgulu S, Eren M, Aksoy M (2008) ABO blood group distribution and major cardiovascular risk factors in patients with acute myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis* **19**: 231-234

Seltsam A, Hallensleben, Kollomann A, Blasczyk R (2003) The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood* **102**: 3035-3042

Sharara AI, Abdul-Baki H, ElHajj I, Kreidieh N, Kfoury-Baz EM. Association of gastroduodenal disease phenotype with ABO blood group and *Helicobacter pylori* virulence specific serotipes. *Dig Liver Dis* **38**: 829-833

Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd (1998) Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med* **158**: 585-593

Steptoe A, Kivimäki M (2012) Stress and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* **9**: 360–370

Sousa NC, Anicchino-Bizzacchi JM, Locatelli MF, Castro V, Barjas-Castro M (2007) The relationship between ABO groups and subgroups, factor VIII and von Willebrand factor. *Haematologica* **92**: 236-239

Suadicani P, Hein HO, Gyntelberg F (2008) Wine intake, ABO phenotype, and risk of ischemic heart disease and all-cause mortality: the Copenhagen Male Study--a 16-year follow-up. *Alcohol* **42**: 575-582

Šimundić AM i sur (2008) *Osnove biostatistike u svakodnevnoj praksi*. Priručnik za trajno usavršavanje HKMB. Medicinska naklada.

Teupser D, Baber R, Ceglarek U, Scholz M, Illig T, Gieger C, Holdt LM et all (2010) Genetic regulation of serum phytosterol levels and risk of coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet* **3**: 331-339

Thygesen K, Alpert JS, White HD (2007) Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* **28** : 2525–2538

Tirado I, Mateo J, Soria J, Oliver A, Martinez-Sanchez E, Vallve C, Borrell M, Urrutia T, Fontcuberta J (2005) The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* **93**: 468–474

Tosetto A, Missiaglia E, Frezzato M, Rodeghiero F (1997) The VITA project: C677T mutation in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene and risk of venous thromboembolism. *Br J Haematol* **97**: 804–806

Tripodi A, Negri B, Bertina RM, Mannusi PM (1997) Screening for the FV:Q 506 mutation. Evaluation of thirteen plasma-based methods for their diagnostic efficacy in comparison with DNA analysis. *Thromb Haemost* **78**: 339-343

Tursen U, Tiftik EN, Unal S, Gunduz O, Kaya TI, Camdeviren H, Ikizoglu G (2005) Relationship between ABO blood groups and skin cancers. *Dermatol Online J* **11** : 44

Ulger AF, Keklik T, Kumbasar OO, Arbak P, Demirkazýk A, Güngör A, Erekul S, Alper D (2002) Prognostic significance of blood group antigen expression of tumor tissue in lung cancer patients. *Tumori* **88**: 395-399

Valensi P, Lorgis L, Cottin Y (2011) Prevalence, incidence, predictive factors and prognosis of silent myocardial infarction: a review of the literature. *Arch Cardiovasc Dis* **104**: 178–188

Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR (1994) Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* **344**: 1453-1457

Van Schie MC, de Maat, MPM, de Groot, PG, Hyseni A, Dippel DWJ, Lenting PJ, Leebeek FWG, Hollestelle MJ (2010) Active von Willebrand factor and the risk of stroke *Atherosclerosis* **208**: 322-323

Van Schie MC, Van Loon JE, De Maat MPM, Leebeek FWG (2011) Genetic determinants of von Willebrand factor levels and activity in relation to the risk of cardiovascular disease: a review. *J Thromb Haemost* **9**: 899–908

Von Beckerath N, Koch W, Mehilli J et al. (2004) ABO locus O1 allele and risk of myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis* **15**: 61-67

Watkins M (2001) The ABO blood group system: historical background. *Transfus Med* **11**: 243-265

Waziralli H, Ashfaque RA, Herzig JW (2005) Association of blood group A with increased risk of coronary heart disease in the Pakistani population. *Pak J Physiol* **1**: 582-586

White RH (2003) The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation* **107**: 4-8

Wiggins KL, Smith NL, Glazer NL, Rosendaal FR, Heckbert SR, Psaty BM, Rice KM, Lumley T (2009) ABO genotype and risk of thrombotic events and hemorrhagic stroke. *J Thromb Haemost* **7**: 263-269

Whincup PH, Cook DG, Phillips A *et al*. (1990) ABO blood group and ischaemic heart disease in British men. *BMJ* **30**: 1679

Wolpin BM, Chan AT, Hartge P, Chanock SJ, Kraft P, Hunter DJ, Giovannucci EL, Fuchs CS (2009) ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* **101**: 424–431

Wolpin BM, Kraft P, Gross M, Helzlsouer K, Bas Bueno-de-Mesquita H, et al. (2010) Pancreatic Cancer Risk and ABO Blood Group Alleles: Results from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium *Cancer Res* **70**: 1015-1023

World Health Organization (2011) *The Global Burden of Disease: 2008 Update*. World Health Organization.

Wong FL, Kodama K, Sasaki H, Yamada M, Hamilton HB (1992) Longitudinal study of the association between ABO phenotype and total serum cholesterol level in a Japanese cohort. *Genet Epidemiol* **9**: 405-418

Wu O, Bayoumi N, Vickers MA, Clark P (2008) ABO(H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* **6**: 62-69

Yamamoto F (1995) Molecular genetics of the ABO histo-blood group system. *Vox Sang* **69**: 1-7

Ye Z, Liu EH, Higgins JP, Keavney BD, Lowe GD, Collins R, Danesh J (2006) Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet* **25**: 651-658

8. ŽIVOTOPIS

Irena Jukić rođena je 11. veljače 1960. godine u Drnišu, gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Na Sveučilištu u Zagrebu diplomirala je Medicinski fakultet 1986. godine. Liječnički staž odradila je na KBC Zagreb, a zatim je radila na zamjenama u ordinacijama opće medicine. Od 1989. godine neprekidno radi u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku gdje je počela kao liječnik u terenskoj ekipi. Godine 1994. imenovana je voditeljem Odjela za uzimanje krvi i promidžbu davalaštva, a od 2001. godine je ravnateljica Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu.

U razdoblju od 1995. do 1997. godine završila je poslijediplomski studij iz Javnog zdravstva. Od 1996. godine je na specijalizaciji iz transfuzijske medicine, a specijalistički ispit položila je 1999. godine. Doktorski studij na Farmaceutsko-biokemijskum fakultetu upisala je 2007. i položila sve ispite. Obranu i prihvaćanje teme imala je 29. lipnja 2009.

Tijekom rada u Zavodu dr Jukić je najveći dio provela u davalaštvu, organizaciji davalaštva, kreiranju promidžbe i edukaciji davatelja, organizatora i kolega koji su rade na okupljanju davatelja i uzimanju krvi u Zagrebu i cijeloj RH.

Od početka je uključena u projekt reorganizacije transfuzijske službe, a kao Predsjednica Povjerenstva za transfuzijsku medicinu aktivno sudjeluje u provođenju iste. Bila je i članica pregovaračkog tima za Poglavlje 28.

Udovoljavajući svim zahtjevima, odlukom Povjerenstva za dodjelu naziva 2010. godine Irena Jukić dobiva naziv primarijus.

Tijekom rada u HZTM sudjelovala je na brojnim domaćim i međunarodnim stručnim skupovima, kongresima, tečajevima i kao predavač i kao organizator. Autor i koautor je velikog broja stručnih i znanstvenih radova, kongresnih priopćenja i preglednih članaka.

Članica je Hrvatskog društva za hematologiju i transfuzijsku medicinu (HDHTM), International Society of Blood Transfusion (ISBT), Europian Blood Alliance (EBA).

Udata je i majka dvoje djece.

CC radovi povezani s temom doktorskog rada:

Jukić I, Bingulac-Popović J, Đogić V, Babić I, Culej J, Tomičić M, Vuk T, Šarlija D, Balija M (2009) ABO Blood Groups and Genetic Risk Factors for thrombosis in Croatian Population. *Croat Med J.* **50**: 550–558

Đogić V, Bingulac-Popović J, Babić I, Hundrić-Hašpl Z, Juraković-Lončar N, Mratinović-Mikulandra J, Vuk T, Balija M, Jukić I (2011) Distribution of weak D types in the Croatian population. *Transfus Med* **21**: 278-279

Jukić I, Bingulac-Popović J, Đogić V, Hećimović A, Babić I, Batarilo I, Maglov Č, Šturm D: Evaluation of ABO blood groups as risk factor for myocardial infarction. *Blood Transfusion in press.*

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
A.Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

UČESTALOST GENOTIPOVA ABO SUSTAVA KRVNIH GRUPA U OBOLJELIH OD TROMBOEMBOLIJA U HRVATSKOJ

Irena Jukić

SAŽETAK

Brojna istraživanja u posljednjih desetak godina usmjerena su otkrivanju biološke uloge sustava krvnih grupa, te su i pokazala veću ili manju povezanost između ABO sustava krvne grupe i nekih bolesti, kao što su kardiovaskularne, gastrointestinalne, tumorske i infektivne. Tromboembolijske bolesti su veliki javnozdravstveni problem i jedan od vodećih uzroka mortaliteta populacije. Zbog toga je od velikog značenja utvrditi čimbenike rizika koji su uključeni u razvoj ovih bolesti, kako bi mogli spriječiti nastanak, ponavljanje trombotičkih epizoda i poboljšati liječenje. Poznato je da nositelji ne-O krvne grupe ABO sustava imaju povećani trombotički rizik. Razlika između O i ne-O KG je u razini glikoproteina von Willebrand u plazmi koja je za 25-30% niža kod osoba s O krvnom grupom, u odnosu na ne-O krvne grupe. Smatra se da je to posljedica izravnog funkcionalnog utjecaja ABO genskog lokusa, ali mehanizam nije razjašnjen.

Cilj istraživanja bio je utvrditi povezanost ABO genotipova i genetičkih protrombotičkih čimbenika kao genetičkih čimbenika rizika za razvoj tromboze (FV Leiden, protrombin G20210A i metilentetrahidrofolat reduktaza C677T) u hrvatskoj populaciji.

Istraživanjem je obuhvaćeno 164 bolesnika s venskom trombozom,182 bolesnika s arterijskom trombozom i 303 asimptomatska dobrovoljna davatelja krvi koji su predstavljali kontrolnu skupinu.Genotipizacija na 5 osnovnih alela i 15 genotipova bila je izvedena pomoću PCR-SSP metode, protrombotičke mutacije načinjene su pomoću metoda PCR-SSP, PCR-RFLP i RT-PCR.

Dobiveni rezultati ovog istraživanja pokazuju povećani trombotički rizik kod ne-OO nositelja u odnosu na OO nositelje genotipova za razvoj tromboembolijskih bolesti. Utvrđen je veći rizik za obolijevanje od tromboembolijskih bolesti kod nositelja genotipova O1B/O2B/BB i AB/ A2B tj. A i B alela, gdje bolesnici imaju povećanu rizik za VTE u odnosu na nositelje OO alela. Kod infarkta miokarda niti jedan ne-OO genotip ne povećava trombotički rizik. Mutacija FVL u skupini ne-OO nositelja povećava izglede za razvoj venske tromboze oko 9 puta, za nositelje MTHFR 677TT povećava ih za oko 4 puta, dok mutacija FII G20210A kod ne-OO nositelja kao čimbenik rizika nema značenje. Protrombotički genetički čimbenici niti u jednoj skupini ne doprinose povećanju rizika za razvoj arterijske tromboembolije, tj. akutnog infarkta miokarda.

Rad predstavlja temelje za istraživanje ABO sustava krvnih grupa kao genetičkog čimbenika rizika za druge kardiovaskularne bolesti, kao i gastrointestinalne, tumorske i infektivne bolesti.

Ključne riječi: ABO krvne grupe, venske i arterijske tromboembolije, genetički čimbenici rizika za trombozu, ABO genotipovi

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakultetaSveučilišta u Zagrebu

Rad sadrži: *106 stranica, 27 slika, 26 tablica i 146 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.*

Ključne riječi *ABO krvne grupe, venske i arterijske tromboembolije, genetički čimbenici rizika za trombozu, ABO genotipovi*

Mentor: *dr.sc.* ***Jasna Bingulac-Popović,*** *viša znanstvena suradnica Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu*

Ocjenjivači: *Prof dr.sc.* ***Renata Zadro****, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb*
Prof.dr sc. ***Mirna Sučić,*** *Farmaceusko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KB Sveti Duh*
Doc. dr.sc. ***Ana-Maria Šimundić*** *Farmaceusko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KB Sestre Milosrdnice*

Rad prihvaćen 23.01.2013.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
A.Kovačića 1, 1000 Zagreb,Croatia

Doctoral thesis

DISTRIBUTION OF ABO GENOTYPES AMONG PATIENTS WITH THROMBOEMBOLISM IN CROATIA

Irena Jukić

SUMMARY

These decades numerous researches were directed to detection of biological function of blood group systems. There have been reports on a lower or higher association between ABO blood groups and cardiovascular, tumour, gastrointestinal, and infectious diseases. Thromboembolic diseases are important public health problem and one of leading cause of population mortality. It is of utmost importance to identify the risk factors implicated in the disease development. Most studies performed to date have generally agreed that non-OO blood group carriers have a higher risk of thrombosis than OO blood group carriers. Differences between O and non-O blood groups are in values of glycoprotein von Willebrand factor in plasma which is by 25-30% lower in O blood group than in non-O blood group. The hypothesis is that this occurs due to the direct functional impact of ABO locus; however, the exact mechanism has not yet been elucidated.

Aim of the study was to assess the association between ABO blood group genotypes and genetic risk factors for thrombosis (FV Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations) in the Croatian population. The study included 164 patients with VTE,182 patients with CAD and 303 asymptomatic blood donors as a control group. Genotyping to 5 common alleles and 15 genotypes was performed by PCR-SSP and prothrombotic mutations were determined by PCR-SSP, PCR-RFLP and RT-PCR methods.

The results show higher thrombotic risk for non-OO carriers compared to OO genotype carriers for the development of thromboembolic diseases. The strongest association with thrombotic risk was recorded for O1B/O2B/BB andi AB/ A2B; carriers of A and B allele have highest VTE risk than OO allele carriers. There was no significant difference between genotypes in the risk of myocardial infarction. FV Leiden increased the risk of thrombosis 9-fold in the group of non-OO carriers, and fourfold in the group of MTHFR 677TT carriers, while there was no significant difference in the risk of thrombosis between OO and non-OO blood groups associated with prothrombin mutation. There was no contribution of prothrombotic genetic factors to risk for development of myocardial infarction.

Study represents a basis for research of ABO blood group system as genetic risk factors for other cardiovascular diseases, as well as gastrointestinal, cancer and infectious diseases.

The Thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Bichemistry.
Thesis includes: 106 pages, 27 figures, 26 tables and 146 references. Original is in Croatian language.
Key Words: ABO blood groups, venous and arterial thromboembolism, genetic thrombotic risk factors, ABO genotypes, FV Leiden, prothrombin G20210A mutation, metylenetetrahydrofolate reductase -C677T mutation

Menthor: ***Jasna Bingulac-Popović,*** *Ph.D, research scientist, Croatian Institute of Transfusion Medicine*
Reviewers: ***Renata Zadro,*** *Ph.D. Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry,University of Zagreb, University Hospital Centre Zagreb*
Mirna Sučić , *Ph.D. Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry,University of Zagreb, Sveti Duh University Hospital*
Ana-Maria Šimundić , *Ph.D. Docent, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Sestre milosrdnice University Hospital*

The thesis is accepted: January 23 , 2013