Polimorfizam sustava HLA a u osoba s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG

Kruhonja Galić, Zrinka

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:603352

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Zrinka Kruhonja Galić

POLIMORFIZAM SUSTAVA HLA U OSOBA S ANTIERITROCITNIM AUTOPROTUTIJELIMA RAZREDA IgG

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Zrinka Kruhonja Galić

POLIMORFIZAM SUSTAVA HLA U OSOBA S ANTIERITROCITNIM AUTOPROTUTIJELIMA RAZREDA IgG

DOKTORSKI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Irena Jukić, prim. dr. med.

Zagreb, 2020



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Zrinka Kruhonja Galić

POLYMORPHISM OF HLA SYSTEM IN INDIVIDUALS WITH ANTI-ERYTHROCYTE AUTOANTIBODIES OF IgG CLASS

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Irena Jukić, PhD, MD

Zagreb, 2020

Ovaj doktorski rad je izrađen u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Irene Jukić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentorica, doc.dr.sc. Irena Jukić, prim.dr.med. je specijalist transfuzijske medicine i ravnateljica Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM) u Zagrebu. Predsjednica je Hrvatskog društva za transfuzijsku medicinu (HDTM) te članica International Society of Transfusion Medicine (ISBT) i European Blood Alliance (EBA). Osim stručnog rada u HZTM, bavi se i znanstvenim radom. Docent je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Osijeku te je objavila više stručnih i znanstvenih radova. U posljednje 4 godine objavila je slijedeće znanstvene radove:

1. Kruhonja Galic Z, Jagnjic S, Bingulac-Popovic J, Planinc-Peraica A, Hecimovic A, Strauss Patko M, Jukic I 2020) Warm red blood cell autoantibodies and clinical diagnosis in patients with or without autoimmune hemolyses. Transfusion Clinique et biologique 27: 25-29.
2. Samardžija M, Drenjančević D, Miletić M, Slavulj B, Jukić I, Zibar L, Mihaljević S, Ferenc Kiš M, Samardžija M (2020) The impact of positive anti-HBC marker on permanent deferral of voluntary blood donors in eastern Croatia and estimation of occult hepatitis B virus infection rate. Acta Clinica Croatica 59: 126-134.
3. Miletić M, Bingulac-Popović J, Stojić Vidović M, Hećimović A, Berendika M, Babić I, Đogić V, Samardžija M, Barišić K, Jukić I, Mihaljević I (2019) Anti-HBc prevalence among Croatian blood donors over a 14-years period (2004-2017): Assessment of trends, risks and need for implementing routine testing. Transfusion clinique et biologique 26:257-262.
4. Lampalo M, Majer M, Jukić I, Safić Stanić H, Barišić B, Popović-Grle S (2019) Health Sequelae of Tobacco Exposure in Childhood and Adolescence. Psychiatria Danubina 1: 39-43.
5. Ozretić P, da Silva F, Miguel I, Catalano C, Sokolović I, Vukić-Dugac A, Šutić M, Kurtović M, Bubanović G, Popović-Grle S, Skrinjarić-Cincar S, Vugrek O, Jukić I, Rumora L, Bosnar M, Samaržija M, Bals R, Jakopović M, Försti A, Knežević I (2019) Association of NLRP1 Coding Polymorphism with Lung Function and Serum IL-1β Concentration in Patients Diagnosed with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Genes (Basel) 10: 783.
6. Babić I, Bojić M, Maleš Ž, Zadro R, Gojčeta K, Duka I, Rimac H, Jukić I (2019) Influence of flavonoids' lipophilicity on platelet aggregation. Acta pharmaceutica 69: 607-619.

7. Vuk Pisk S, Vuk T, Ivezic E, Jukic I, Bingulac-Popovic J, Filipcic I (2018) ABO blood groups and psychiatric disorders: a Croatian study. Blood Transfus 15: 1-6.
8. Lampalo M, Jukić I, Bingulac-Popović J, Safić H, Ferara N, Popović-Grle S (2018) The role of PAI-1 gene 4G/5G polymorphism and diagnostic value of biomarkers in allergic and non-allergic asthma phenotype. Acta Clin Croat 57: 96-102.
9. Jukić I, Bingulac Popović J, Samardžija M, Lampalo M, Hećimović A, Đogić V, Strauss Patko M (2017) Raspodjela glavnih alela sustava ABO krvnih grupa u hrvatskoj populaciji. Acta Med Croatica 71: 235-240.
10. Markulin D, Vojta A, Samaržija I, Gamulin M, Bečeheli I, Jukić I, Maglov Č, Zoldoš V, Fučić A (2017) Association Between RASSF1A Promoter Methylation and Testicular Germ Cell Tumor: A Meta-analysis and a Cohort Study. Cancer Genomics Proteomics. 14: 363–372.
11. Babic I, Maslovic M, Vuk T, Safic Stanic H, Topic Sestan P, Kursar M, Bingulac-Popovic J, Dogic V, Jukic I (2017) Detection of three blood donors with multiple myeloma by routine viral individual-donor nucleic acid testing screening. Transfusion 57: 2813-2814.
12. Safic Stanic H, Babić I, Maslović M, Đogić V, Bingulac-Popović J, Miletić M, Juraković-Lončar, Vuk T, Strauss-Patko M, Jukić I (2017) Three-Year Experience in NAT Screening of Blood Donors for Transfusion Transmitted Viruses in Croatia. Transfus Med 44: 415-420.
13. Vuk T, Bingulac-Popović J, Očić T, Mayer Lj, Milošević M, Jukić I (2017) Combined cell index in assessing blood donor iron stores. Transfus Med 27: 16-24.
14. Lampalo M, Jukić I, Bingulac-Popović J, Marunica I, Petlevski R, Pavliša G, Popović-Grle S (2017) Polymorphism 4G/5G of the plasminogen activator inhibitor 1 gene as a risk factor for the development of allergic rhinitis symptoms in patients with asthma. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology 274: 2613-2619.

ZAHVALA:

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ireni Jukić, višoj znanstvenoj suradnici koja je na čelu Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu osigurala materijalnu i stručnu potporu za provođenje ovog doktorskog studija i izradu istraživanja. Zahvaljujem joj na motivaciji i pomoći koju mi je pružila i u teškim i izazovnim trenucima, te na korisnim savjetima, brižnosti, radosti, dobroti i entuzijazmu koje mi je nesebično davala, a posebno pri završetku izrade i pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem svojoj prvoj mentorici dr. sc. Jasni Bingulac-Popović, znanstvenoj savjetnici pod čijim je mentorstvom osmišljena tema, učinjena prijava i obrana teme i započelo istraživanje. Zahvaljujem joj za sve savjete, znanje i vrijeme koje mi je davala. Hvala joj za pomoć pri usmjeravanju tijekom većeg dijela istraživanja.

Zahvaljujem svim djelatnicama odjela za molekularnu dijagnostiku, a posebno dr Vesni Đogić za pomoć pri odabiru teme, savjetima tijekom početne faze rada, provođenju molekularnog testiranja i očitanja rezultata kontrolne skupine, te Renati Kundid i Višnjici Kirin na pomoći pri provođenju molekularnog dijela istraživanja i očitanju rezultata skupine bolesnika.

Zahvaljujem svim djelatnicima odjela za eritrocitnu dijagnostiku na pomoći u prikupljanju uzoraka i provođenju imunohematološkog dijela istraživanja, a posebno dr Sandri Jagnjić na konstruktivnoj kritici.

Zahvaljujem dr Ivani Maričić iz KB Dubrava, dr Vjeranu Vuiću iz OB Karlovac i dr sc Slavici Dajak iz KBC Split na pomoći u prikupljanju uzoraka.

Zahvaljujem dr Jadranki Gulan Harcet i djelatnicima Odjela za kontrolu kvalitete na pomoći u određivanju broja retikulocita.

Zahvaljujem dr. sc. Ani Hećimović na pomoći u statističkoj obradi podataka.

Zahvaljujem dr. sc. Tomislavu Vuku na stručnim savjetima.

Zahvaljujem svojim učiteljicama prim.dr.sc. Željki Hundrić-Hašpl na idejama i znanstvenoj radoznalosti i dr Nini Juraković Lončar na ustrajnosti i dosljednosti. Hvala im što su mi svakodnevno prenosile svoje znanje i iskustvo iz imunohematologije.

Zahvaljujem svim svojim prijateljima na nesebičnoj podršci.

Zahvaljujem svojoj obitelji na beskrajnoj ljubavi. Hvala mojim kćerima Maji i Luciji i mome suprugu Ivici što su strpljivo podnosili brojna usamljena popodneva i vikende.

Hvala mojoj majci na bezuvjetnoj potpori.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

POLIMORFIZAM SUSTAVA HLA U OSOBA S ANTIERITROCITNIM AUTOPROTUTIJELIMA RAZREDA IgG

ZRINKA KRUHONJA GALIĆ

Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

Humani leukocitni antigeni (HLA) reguliraju imunološke reakcije. Dosadašnja istraživanja utvrdila su povezanost polimorfizama gena sustava HLA s nastankom autoimunih bolesti. Antieritrocitna autoprotutijela (AP) mogu uzrokovati autoimunu hemolitičku anemiju (AIHA) koja se češće javlja u osoba s limfoproliferativnim i autoimunim bolestima i uzrokuju smanjenje životnog vijeka eritrocita. Cilj ovog doktorskog rada bio je ispitati moguću povezanost različitih alela sustava HLA razreda I i II s nastankom antieritrocitnih autoprotutijela razreda IgG u bolesnika i trudnica. Usporedbom rezultata HLA PCR-SSP (*engl. Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primer)* tipizacije uzoraka bolesnika i trudnica s AP-ima razreda IgG, te zdravih ispitanika bez AP, utvrđena je moguća povezanost alela B*57 i DQB1*03:03 s pojavom antieritrocitnih autoprotutijela razreda IgG. Ovim istraživanjem nije otkriven protektivni alel.

(116 stranica / 18 slika / 38 tablica / 229 literaturnih navoda / jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: HLA, antieritrocitna autoprotutijela IgG, AIHA, autoimunost

Mentor: dr. sc. Irena Jukić, docentica, dr. med., viša znanstvena suradnica

Ocjenjivači: dr. sc. Dubravka Hranilović, redovna profesorica
dr. sc. Snježana Židovec Lepej, docentica, znanstvena savjetnica
dr. sc. Mirta Milić, viša znanstvena suradnica

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Doctoral thesis

POLYMORPHISM OF HLA SYSTEM IN INDIVIDUALS WITH ANTIERYTROCITE AUTOANTIBODIES OF IgG CLASS

ZRINKA KRUHONJA GALIĆ

Croatian Institute of Transfusion Medicine

Human leucocyte antigens (HLA) regulate an immune response. Previous studies have established a correlation of HLA polymorphisms with the development of autoimmune diseases. Antierytrocite autoantibodies (AB) may result in occurence of autoimmune haemolytic anaemia (AIHA), which is more frequent in individuals with lymphoproliferative and autoimmune diseases, and cause a decreased lifetime of erythrocytes. The aim of this doctoral thesis was to investigate the possible association of different HLA class I and II alleles with the development of RBC (*engl. Red Blood Cell)* autoantibodies of IgG class. Comparing the results of HLA PCR-SSP (*engl. Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primer)* typing of patients with AB of IgG class and healthy individuals without AB, we found that alleles B*57 and DQB1*03:03 are susceptible for RBC AB development. In this investigation we did not observed any protective allele.

(116 pages / 18 figures / 38 tables / 229 references / original in Croatian)

Key words: HLA, RBC autoantibodies IgG, AIHA, autoimmunity

Supervisor: Irena Jukić, PhD, MD

Rewiewers: Dubravka Hranilović, PhD, Professor
Snježana Židovec Lepej, PhD, Assistant Professor
Mirta Milić, PhD, Senior Scientific Associate

Sadržaj

1.	**UVOD**	1
2.	LITERATURNI PREGLED	3
2.1.	MOLEKULE GLAVNOG KOMPLEKSA TKIVNE PODUDARNOSTI	3
2.1.1.	Otkriće molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti	3
2.1.2.	Otkriće molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti u ljudi	3
2.1.2.1.	Smještaj i organizacija gena HLA	4
2.1.2.2.	Polimorfizam gena HLA	5
2.1.2.3.	Neravnoteža vezanja	7
2.1.2.4.	Nomenklatura HLA alela	7
2.1.2.5.	Građa molekula HLA razreda I	8
2.1.2.6.	Građa molekula HLA razreda II	9
2.1.2.7.	Funkcija molekula HLA razreda I i razreda II	10
2.1.2.8.	Preradba i predočavanje antigena	12
2.2.	IMUNOTOLERANCIJA I AUTOIMUNOST	13
2.2.1.	Središnja tolerancija limfocita T	14
2.2.2.	Periferna tolerancija limfocita T	15
2.2.3.	Središnja tolerancija limfocita B	16
2.2.4.	Periferna tolerancija limfocita B	17
2.2.5.	Mehanizmi autoimunosti	17
2.3.	POVEZANOST SUSTAVA HLA S AUTOIMUNIM BOLESTIMA	18
2.3.1.	Povezanost sustava HLA s autoimunom hemolitičkom anemijom (AIHA)	21
2.3.2.	Povezanost sustava HLA s antieritrocitnim aloprotutijelima	22
2.4.	UČESTALOST ALELA POJEDINIH HLA LOKUSA	22
2.5.	AUTOIMUNA HEMOLITIČKA ANEMIJA (AIHA)	30
2.5.1.	Uvod	30
2.5.2.	Epidemiologija	31
2.5.3.	Patogeneza	33
2.5.3.1.	Autoprotutijela i komplement u patogenezi AIHA	34
2.5.4.	Klinička slika tople AIHA	35
2.5.5.	Laboratorijski pokazatelji tople AIHA	35

2.5.6.	Liječenje tople AIHA	37
3.	ISPITANICI I METODE	39
3.1.	ISPITANICI	39
3.1.1.	Etička odobrenja	39
3.1.2.	Bolesnici i trudnice s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG	39
3.1.3.	Kontrolna skupina	40
3.2.	POPIS I SASTAV UPORABLJENIH KEMIKALIJA	41
3.3.	PRIBOR I APARATURA	42
3.4.	METODE	43
3.4.1.	Direktni antiglobulinski test (DAT)	43
3.4.2.	Test elucije	44
3.4.2.1.	Postupak eluiranja autoprotutijela	44
3.4.3.	Određivanje broja retikulocita	45
3.4.4.	Izolacija genomske DNA iz leukocita periferne krvi	45
3.4.4.1.	Postupak izolacije DNA	46
3.4.4.2.	Ispitivanje kvalitete DNA	47
3.4.5.	PCR-SSP metoda za HLA tipizaciju	47
3.4.5.1.	Protokol za pripravljanje PCR mješavine za PCR reakciju	50
3.4.5.2.	Elektroforeza umnoženih produkata PCR-SSP u gelu agaroze	52
3.4.6.	Očitavanje rezultata	53
3.5.	STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	54
4.	REZULTATI	55
4.1.	Aleli HLA razreda I - skupina AA *vs.* kontrolna skupina	60
4.2.	Aleli HLA razreda II - skupina AA *vs.* kontrolna skupina	63
4.3.	Pretpostavljene haplotipske sveze - skupina AA *vs.* kontrolna skupina	69
4.4.	Aleli HLA razreda I - usporedba skupina AIHA, AP i kontrolne skupine	70
4.5.	Aleli HLA razreda II - usporedba skupina AIHA, AP i kontrolne skupine	71
5.	RASPRAVA	80
6.	ZAKLJUČCI	94

7.	POPIS LITERATURE	96
8.	ŽIVOTOPIS	115

1. UVOD

Autoimuna hemolitička anemija (AIHA) je rijetka multigenska autoimuna bolest u kojoj različiti tipovi autoprotutijela usmjereni na antigene eritrocitne membrane uzrokuju smanjenje životnog vijeka eritrocita. Antieritrocitna autoprotutijela razreda IgG detektiraju se tijekom prijetransfuzijskog ispitivanja bolesnika s različitim dijagnozama sa i bez znakova hemolize kao i kod trudnica, ali i kod zdravih osoba bez poznatog razloga. Dosadašnji vrlo mali broj istraživanja također na malom broju uzoraka još uvijek nije dokazao povezanost antieritrocitnih autoprotutijela s određenim alelom HLA (engl. *Human Leukocyte Antigens*) sustava.

Očekivana povećana učestalost određenih alela HLA u bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima u odnosu na kontrolnu skupinu potvrdila bi pretpostavku o mogućoj povezanosti gena sustava HLA sa stvaranjem autoimunog odgovora na eritrocitne antigene, a HLA bi mogao postati novi genetički biljeg u osoba s laboratorijskim znacima AIHA. Očekujemo kako bi rezultati istraživanja mogli pridonijeti boljem razumijevanju čimbenika koji utječu na nastanak antieritrocitnih autoprotutijela razreda IgG i razvoja autoimune hemolitičke anemije.

Ciljevi rada

- Ispitati i utvrditi alele sustava HLA bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG
- Usporediti alele sustava HLA bolesnika i trudnica s alelima HLA kontrolne skupine (dobrovoljnih davatelja krvi)
- Utvrditi rizični/e alel/e za pojavu antieritrocitnih autoprotutijela razreda IgG
- Ispitati prisutnost autoimunih i ostalih bolesti u bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG
- Utvrditi mogući protektivni alel za pojavu antieritrocitnih autoprotutijela razreda IgG

Metode

- Za dokazivanje vezanih antieritrocitnih autoprotutijela različitih imunoglobulinskih razreda (IgM, IgG, IgA) i podrazreda (IgG1, IgG3) odabrana je gel mikrohemaglutinacijska metoda koja koristi princip Coombsovog testa, specifičnim vezanjem polispecifičnog i monospecifičnog antihumanog gamaglobulina na imunoglobuline *in vivo* vezane na eritrocitnu membranu ispitanika.

- Elucija antieritrocitnih autoprotutijela radit će se toplinskom metodom i koristiti kao dodatna provjera vezanih autoprotutijela na antigene eritrocitne membrane, a radi isključivanja neimunološke adsorpcije proteina ili lijeka, te isključivanja protutijela usmjerenih na lijek.
- Broj retikulocita određivat će se metodom protočne citometrije na multiparametrijskom hematološkom analizatoru koji koristi reagens na bazi boje New Methylen Blue za bojanje RNA retikulocita.
- Izolacija deoksiribonukleinskih kiselina (DNA) iz biološkog materijala pomoću silika-gel membrane temeljit će se na postupku vezanja-ispiranja-eluiranja. Elektroforetskim razdvajanjem na 0,5 %-tnom agaroznom gelu provjerit će se kvaliteta izolirane DNA i njen prinos.
- Aleli sustava HLA ispitat će se metodom lančane reakcije polimerazom (PCR, *engl. Polymerase Chain Reaction*), *in vitro* reakcijom umnožavanja ciljnog dijela DNA pomoću enzima Taq polimeraze, korištenjem specifične oligonukleotidne početnice specifične za sekvencu (SSP, *engl. Sequence Specific Primer*), koje prepoznaju i komplementarno se vežu na dijelove kalupa DNA.
- Detekcija produkata PCR amplifikacije radit će se pomoću elektroforeze na 1,5% agaroznom gelu s bojom etidijevim-bromidom. Specifičnost svake pojedine amplifikacije provjerit će se pomoću tablica za interpretaciju, koje su priložene uz svaki komercijalni HLA-SSP set i pomoću HELMBERG SCORE Software-a

Polazna hipoteza

Znanstvena pretpostavka istraživanja je mogućnost postojanja povezanosti određenih alela HLA s nastankom antieritrocitnih autoprotutijela razreda IgG.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. MOLEKULE GLAVNOG KOMPLEKSA TKIVNE PODUDARNOSTI

2.1.1. Otkriće molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti

Otkriće leukocitnih antigena vezano je uz istraživanja transplantacije mišjih tumora američkih genetičara Tyzzera i Littlea, te istraživanja Gorera, britanskog liječnika i patologa, koji je 1936. otkrio antigen odgovoran za odbacivanje transplantata (Gorer i sur., 1936., Thorsby i sur., 2009.). Kasnije se Gorer pridružio genetičaru Snellu u proučavanju gena otpornih na tumor, takozvanih gena *H* (engl. *histocompatibility*), te su njih su dvojica zajedno sa suradnicima utvrdili postojanje gena koji kodira jake ili glavne antigene tkivne podudarnosti u miša tj. lokus *H-2* (Gorer i sur., 1948.). Daljnjim otkrićima uočena je velika složenost lokusa *H-2* te je on preimenovan u *H-2* kompleks ili glavni kompleks (sustav) tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex,* MHC). Rezultati biokemijskih studija pokazali su podudarnost i sličnu osnovnu građu i u mišje bjelančevine H-2 i ljudske bjelančevine HLA (engl. *human leukocyte antigens*) posjeduju sličnu osnovnu građu. Geni koji određuju sudbinu presađenog tkiva prisutni su u svim vrstama sisavaca i homologni mišjim genima *H-2,* te su zbog toga nazvani glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (geni MHC), a ostali geni koji manje utječu na sudbinu presatka nazvani su slabim ili sporednim genima tkivne podudarnosti (engl. *minor histocompatibility genes*). Geni koji nekoj jedinki osiguravaju stvaranje imunosnog odgovora u obliku protutijela na pojedine proteinske antigene nazvani su geni imunosnog odgovora (engl. *immune response genes*, Ir) i pripadaju sustavu MHC. Naslijeđeni aleli MHC kodiraju molekule MHC koje prepoznaju peptid iz određenog antigena i stvaraju komplekse peptida tog antigena i molekula MHC. Te komplekse prepoznaju pomagački T limfociti, koji zatim pomažu B limfocitima u proizvodnji protutijela (Abbas i sur., 2018.). Zinkernagel i Doherty dokazali su direktnu uključenost molekule MHC u T-stanično prepoznavanje antigena (restrikcija molekulama MHC), ali bez poznatog mehanizma (Zinkernagel i Doherty, 1974.). Funkcija molekula HLA otkrivena je tek 1987. kada je, uz pomoć X-zraka, prikazana kristalna struktura molekule HLA-A2 i žlijeb unutar kojeg je bio vezan peptid (Bjorkman i sur., 1987.).

2.1.2. Otkriće molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti u ljudi

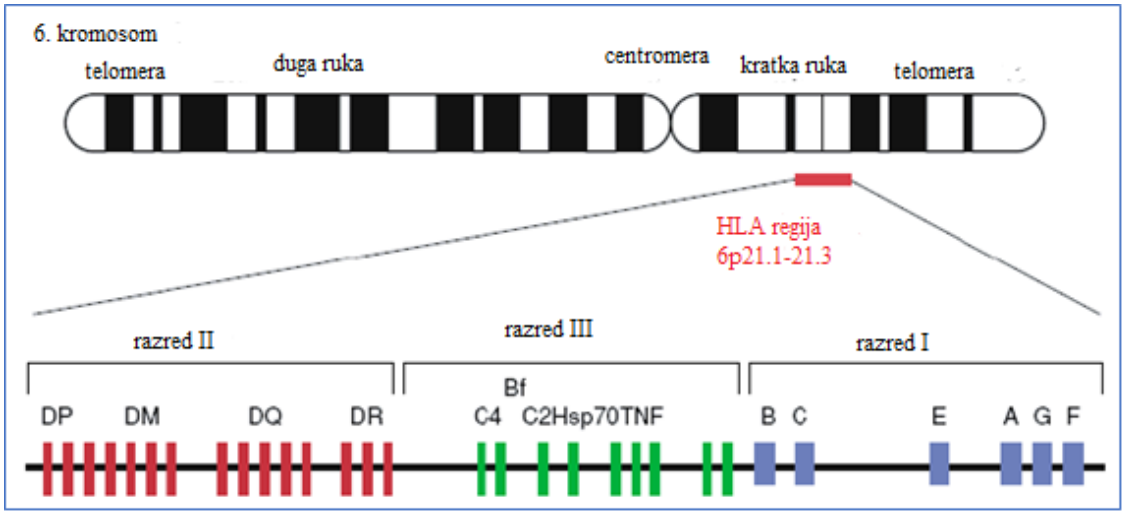
Sustav HLA otkriven je nekoliko godina nakon otkrića većine eritrocitnih sustava krvnih grupa i nakon revolucionarnog otkrića antihumanog gamaglobulinskog (Coombsovog) testa. Leukocitne krvne ljudske grupe prvi puta se spominju 1954. (Miescher i Fauconnet, 1954.).

Dausset, van Rood i Payne sa suradnicima gotovo istovremeno dolaze do otkrića i opisuju nastanak protutijela na leukocitne antigene nakon transfuzije i tijekom trudnoće (Dausset, 1954., Payne i Rolfs, 1958., van Rood i sur., 1958.). Dausset je na leukocitima triju dobrovoljaca otkrio prvi antigen HLA i njima u čast nazvao ga antigen MAC (kasnije HLA-A2), prema njihovim inicijalima (Dausset, 1958.). Već tada je dao naslutiti klinički značaj leukocitnih antigena u transplantaciji tkiva i koštane srži. Za svoj rad je 1980., zajedno sa Snellom i Benacerrafom, dobio Nobelovu nagradu. Van Rood je 1962. otkrio nove antigene koje je nazvao 4a i 4b (kasnije HLA-Bw4 i -Bw6) (van Rood i van Leeuwen, 1963.), a 1964., koristeći serume višerotki, zajedno s Juliom i Walterom Bodmerom Payne je otkrila ne samo LA1 (kasnije HLA-A1) i LA2 (kasnije HLA-A2) nego i LA3 kao dodatni antigen koji pripada istom lokusu (Payne i sur., 1964.). Prvu međunarodnu radionicu o tkivnoj podudarnosti (IHWS, engl. *International Histocompatibility Workshop*) organizirao je Amos 1964., a test mikrolimfocitotoksičnosti koji su otkrili Terasaki i McClelland od tada je postao standardna serološka tehnika tipizacije HLA (Terasaki i McClelland, 1964). Uz potporu Svjetske zdravstvene organizacije 1968. osnovan je komitet za nomenklaturu, koji je aktivan i danas (Thorsby, 2009.). Amos je, poznavajući rad Gorera i Snella o mišjem H-2 sustavu, uočio da bi se i u ljudi moglo raditi o jedinstvenom sustavu gena. Kissmeyer-Nielsen je 1969. uočio križnu reaktivnost između antigena HL-A (danas HLA-A) i antigena grupe Četiri (danas HLA-B). To je dovelo do zaključka da je HLA sustav regija usko povezanih lokusa unutar kojih je moguća križna reaktivnost (Kissmeyer-Nielsen i sur., 1969.). Kissmeyer-Nielsenova grupa je 1970. otkrila i treći zasebni sustav antigena HLA-C, a 1975. još 6 novih antigena HLA-Dw1-6. Lokus je dobio ime *HLA-D*, a kasnije studije su pokazale da se lokus *HLA-D* sastoji od nekoliko blisko vezanih lokusa koji kodiraju antigene DR, DQ i DP (Thorsby i sur., 1970., Thorsby i Piazza, 1975., Thorsby i sur., 2009.).

2.1.2.1. Smještaj i organizacija gena HLA

Geni kompleksa HLA pripadaju imunoglobulinskoj supergenskoj porodici. Obuhvaćaju 7,6 Mb u regiji 6p21.3 na kratkom kraku šestog kromosoma (Slika 1). U HLA bazi podataka (IMGT/HLA Database) trenutno ima 25.756 alela HLA, od kojih 18.691 alela HLA razreda I i 7.065 alela HLA razreda II (Marsh i sur., 2010., Robinson i sur., 2015.). Geni kompleksa HLA podijeljeni su u tri regije: gene HLA razreda I, II i III. Geni HLA razreda I smješteni su telomerno, a uključuju klasične gene A, B i C te neklasične gene E, F i G. Geni HLA razreda II smješteni su centromerno, a uključuju klasične gene DR, DQ i DP i neklasične gene DM i

DO. Geni HLA razreda III smješteni su između gena HLA razreda I i gena HLA razreda II, ali nisu s njima funkcijski povezani (Horton i sur., 2004.).



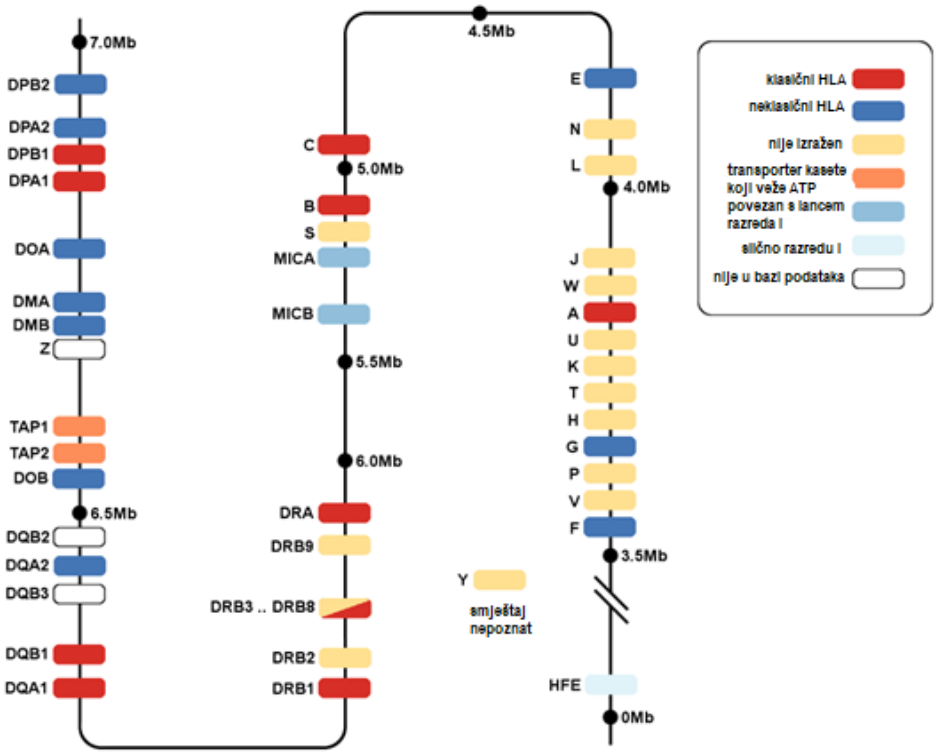
Slika 1. Smještaj kompleksa gena HLA na 6. kromosomu (Berlingerio i sur., 2009.).

2.1.2.2. Polimorfizam gena HLA

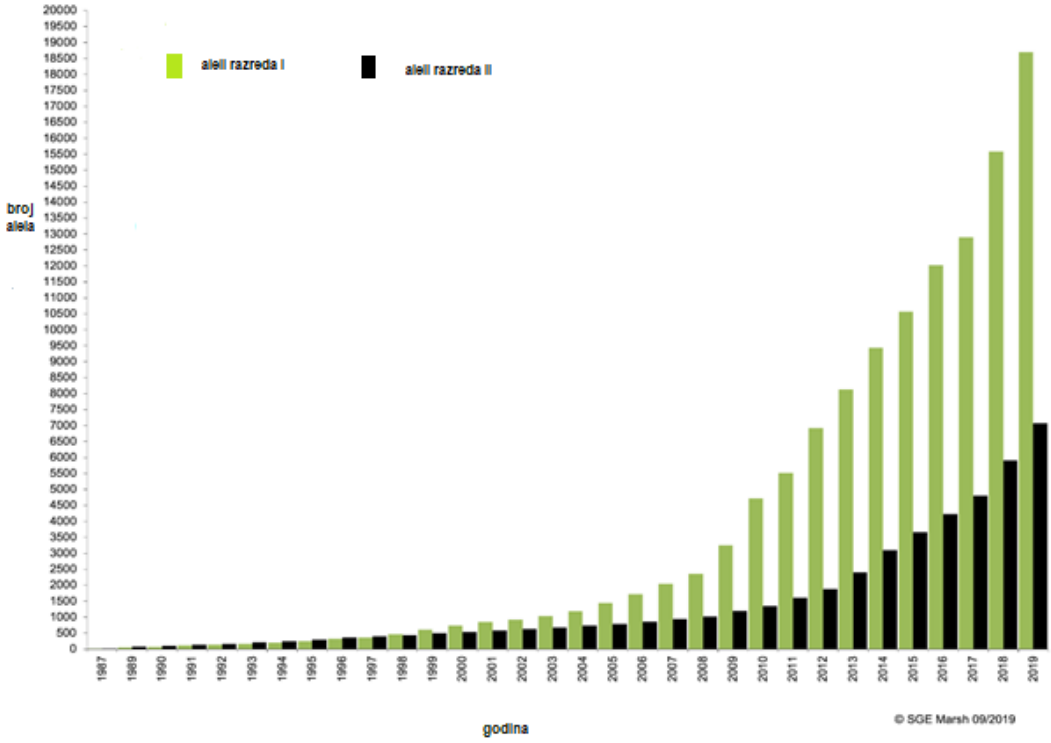
Geni sustava HLA najpolimorfniji su geni (Slika 2) prisutni u genomu sisavaca (Abbas i sur., 2018.). Polimorfizam gena definira se kao pojava dva ili više alela na određenom lokusu unutar populacije, gdje se najmanje dva alela pojavljuju s učestalošću većom od 1%. Na HLA-A lokusu trenutno ima 5.735 alela, na lokusu HLA-B 7.053 alela i na lokusu HLA-C 5.653 alela. HLA-DRB lokus ima 3.296 alela, HLA-DQA1 216 alela i HLA-DQB1 1.771 alel (Marsh i sur., 2010.).

Lokus se smatra polimorfnim kada u njemu postoji više varijacija nego što bi se moglo objasniti samo mutacijama (Slika 3). Polimorfizam gena može predstavljati evolucijsku prednost za određenu populaciju zbog lakše prilagodbe na evolucijske promjene u odnosu na genetski uniformnu populaciju (Bodmer, 1972., Bodmer i sur., 1986.)

Svaki lokus klasičnih gena HLA može imati po 2 različita alela što čini ukupno 12 različitih alela, a oni mogu stvoriti oko 80.000 milijuna različitih kombinacija (Bodmer, 1987.).



Slika 2. Mapa regije HLA (IMGT/HLA Database, 2019)

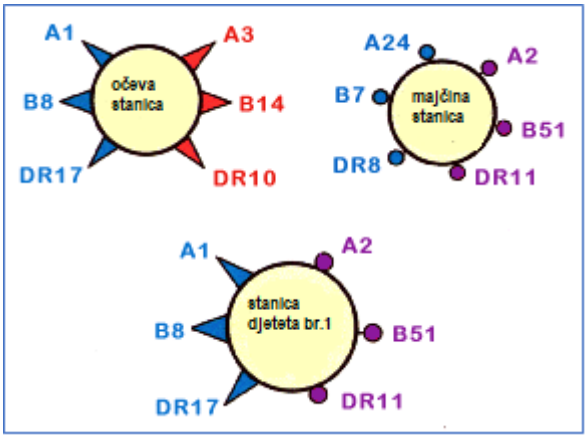


Slika 3. Broj alela sustava HLA od 1987. do rujna 2019. (IMGT/HLA Database, 2019)

2.1.2.3. Neravnoteža udruživanja

Geni blisko vezanih lokusa nasljeđuju se zajedno, te se u populaciji pojavljuju s drugačijom prevalencijom nego geni koji nisu vezani. Radi se o neravnoteži udruživanja (LD, engl. *linkage disequilibrium*), koja predstavlja tendeciju zajedničkog nasljeđivanja specifičnih kombinacija alela dvaju ili više vezanih lokusa s većom učestalosti od one koja bi bila produkt njihovih pojedinačnih frekvencija (Lomas-Francis, 2008.). Tako je učestalost pojavnosti alela HLA-A*01 u sjevernoj Europi oko 31%, a alela HLA-B*08 oko 21%. Učestalost pojavnosti kombiniranog fenotipa A1B8 je oko 17%, što je puno više od očekivanih 6,5% (0,31 x 0,21). Neravnoteža udruživanja jako je izražena između alela lokusa DQ i DR, te između alela lokusa B i C (Bodmer i sur., 1987.).

Skup alela sustava HLA: A, B, C, DR, DQ i DP smještenih zajedno na pojedinom kromosomu neke jedinke naziva se haplotip. Heterozigotne osobe imaju 2 različita haplotipa, a homozigotne jedan haplotip (Ceppellini i sur., 1967.). Izmjena dijelova kromosoma (engl. *crossing over)* i rekombinacije alela unutar regije HLA su rijetki događaji pa se obično na sljedeću generaciju prenosi kompletan haplotip (Slika 4).

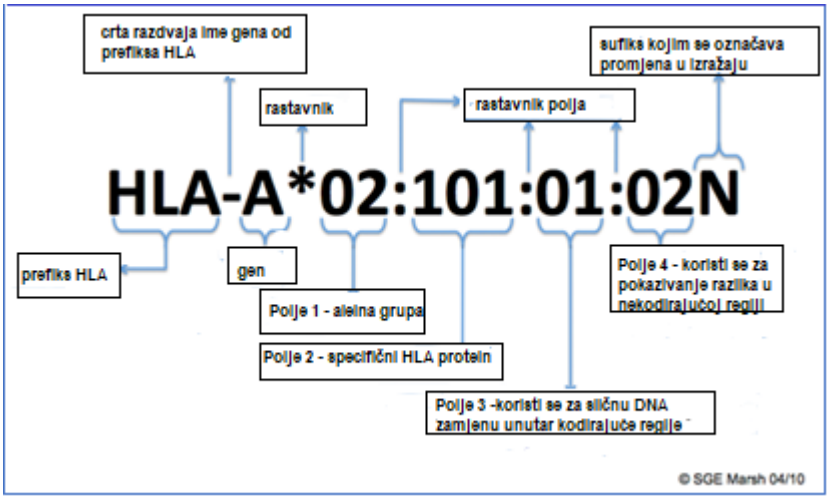


Slika 4. Primjer nasljeđivanja HLA haplotipa (preuzeto i prilagođeno iz https://web.stanford.edu/dept/HPS/transplant/html/hla.html)

2.1.2.4. Nomenklatura

Svaki HLA alel ima svoj jedinstveni naziv koji se sastoji od skupova brojki odijeljenih dvotočkom (Slika 5). Aleli imaju najmanje četiri znamenke, a ostale se znamenke dodaju prema

potrebi. Iza prefiksa HLA piše se crtica i iza nje slovo za oznaku genskog lokusa. Nakon rastavnika označenog zvjezdicom (*), piše se alelna grupa dvjema znamenkama, zatim slijedi dvotočka, pa specifični HLA alel označen s najmanje 2 znamenke. Nakon dvotočke piše se alel koji se razlikuje prema sličnoj mutaciji u kodirajućoj regiji, a iza njega alel koji ima mutaciju u nekodirajućoj regiji. Na kraju se dodaje sufiks u obliku slova koje predstavlja promjene u ekspresiji (izražaju) alela.



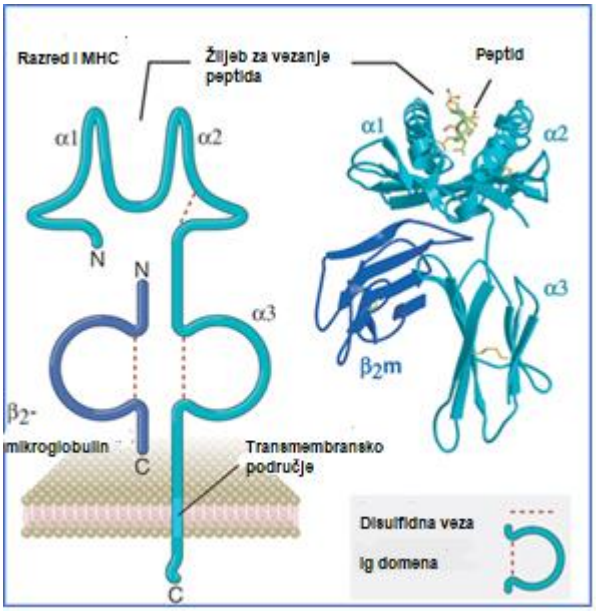
Slika 5. Nomenklatura HLA alela. (preuzeto i prilagođeno iz IMGT/HLA Database)

2.1.2.5. Građa molekula HLA razreda I

Molekula HLA razreda I je heterodimer koji se sastoji od 2 nekovalentno vezana lanca i peptida: α lanac težine 44-47 kD, kodiran je genima HLA, naziva se još i teški lanac i prolazi kroz staničnu membranu, dok β_2 mikroglobulin (β_2m), molekularne težine 12 kDa, ne prolazi kroz membranu i nije kodiran genima HLA. Svaki α lanac usmjeren je s oko tri četvrtine polipeptida u izvanstaničnom prostoru, kratki hidrofobni kraj prolazi kroz staničnu membranu, a aminokiselinski ostaci na C-terminalnom kraju nalaze se u citoplazmi. Sparene domene α_1 i α_2 čine dvije postranične stijenke i naslanjaju se na dno pukotine građene od plohe osmerostrukih antiparalelnih β nabora koji podupiru dva paralelna α lanca (α_1 i α_2). Shematski prikaz je na Slici 6.

Nabor α_1 i α_2 domena tako formira dugu pukotinu ili žlijeb koji je mjesto vezanja peptida u molekuli HLA razreda I. Tu se mogu vezati manji peptidi veličine 8 do 11 aminokiselina. Domena α_3 savija se u Ig domenu i predstavlja konzervirani dio HLA I. Taj dio, zajedno s β_2m sadržava većinu veznog mjesta za molekulu CD8. Na C- terminalnom kraju domene α_3 protežu

se hidrofobne aminokiseline kroz lipidni dvosloj stanične membrane, a na njih se nastavljaju citoplazmatski aminokiselinski ostaci koji su u međudjelovanju s fosfolipidnim glavicama na unutarnjem dijelu lipidnog dvosloja i na taj način sidre molekulu HLA u staničnu membranu. β_2 mikroglobulin je laki lanac molekula HLA razreda I, koji je kodiran genima na 15. kromosomu, građom je homologan Ig domeni i kao i α_3 lanac konstantan u svim molekulama HLA razreda I (Abbas i sur., 2018.).



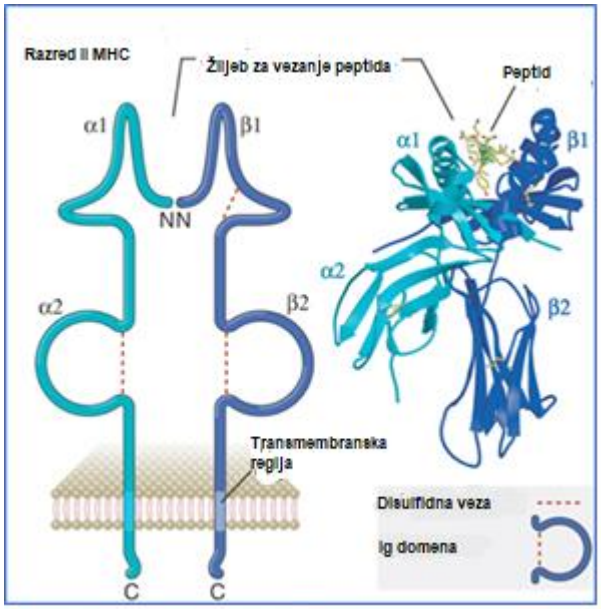
Slika 6. Shematski prikaz građe molekula HLA razreda I i vrpčasti dijagram HLA-B27 dobiven rentgenskom kristalografijom. (preuzeto i prilagođeno iz Abbas i sur., 2018.).

2.1.2.6. Građa molekula HLA razreda II

Molekule HLA razreda II sastoje se od dvaju kovalentno povezanih polipeptidnih lanaca: lanca α (32-34kD) i lanca β (29-32kD). U odnosu na lance molekule HLA razreda I ovdje su oba lanca polimorfna i oba su smještena u HLA lokusu. Domene α_1 i β_1 formiraju žlijeb u koji se vežu peptidi. Shematski prikaz je na Slici 7.

Vezno mjesto u pukotini za HLA razreda II otvoreno je na oba kraja što omogućuje vezanje većih peptida (veličine preko 30 aminokiselina) nego za molekule HLA razreda I. S jedne strane pukotine, odsječak α_1 tvori četiri lanca na dnu pukotine i jednu α uzvojnicu postranično, a s druge strane iste pukotine odsječak β_1 tvori četiri lanca na dnu pukotine i jednu uzvojnicu postranične stijenke. Varijabilne aminokiseline smještene su u lancima α_1 i β_1. U molekulama

HLA razreda II većina varijabilnosti smještena je u lancu β. α_2 i β_2 odsječci molekula HLA razreda II slični su odsječcima α3 i β_2m odsječcima molekula HLA razreda I i nisu varijabilni te se u njih smješta bjelančevina CD4 (Abbas i sur., 2018.).



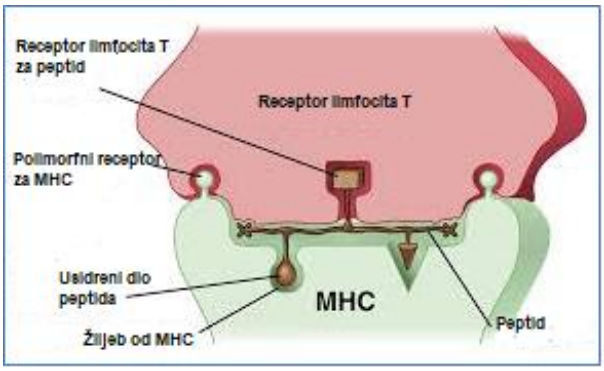
Slika 7. Shematski prikaz građe molekula HLA razreda II i vrpčasti dijagram HLA-DR1 dobiven rentgenskom kristalografijom. Molekule HLA razreda II sliče molekulama HLA razreda I (Abbas i sur., 2018.).

2.1.2.7. Funkcija molekula HLA razreda I i II

Prirođenu ili nativnu imunost karakterizira brz i nespecifičan odgovor na različite mikroorganizme, koji ne može detektirati razlike među mikroorganizmima. Zbog prilagodbe mikroorganizama na ove obrambene snage, složeniji organizmi razvili su puno učinkovitiji sustav stečene ili adaptivne imunosti, u kojem surađuje velik broj imunoloških stanica i molekula. Oba sustava međusobno se isprepliću i zajednički pojačavaju u obrani organizma. Glavne stanice u adaptivnoj imunosti su limfociti B, limfociti T, stanice koje predočuju antigen i izvršne stanice. Za postizanje specifične imunosti limfociti T moraju prepoznati specifični proteinski antigen vezan za vlastite molekule HLA (Slika 8).

Vezanje dijela proteinskog antigena odnosno peptida u žlijeb molekule HLA omogućuju stanice koje predočuju antigen. One su smještene na mjestima najčešćeg ulaza mikroorganizama, to jest stranih proteinskih antigena u ljudski organizam. Nalaze se u sluznici i tkivima probavnog

i dišnog sustava i pomoću receptora na svojim izdancima hvataju proteinske antigene, prerađuju ih u peptide, ugrađuju u molekule HLA na svojoj membrani i tako predočuju limfocitima T. Broj receptora limfocita T je malen i ograničen u odnosu na broj molekula HLA koje su izrazito polimorfne. Aktivirane predočne stanice po ulasku u limfne čvorove izražavaju jako puno molekula HLA s vezanim peptidima, i to kroz duže vrijeme, kao što to rade i limfociti B, koji izražavaju i kostimulacijske molekule potrebne za aktivaciju limfocita T.



Slika 8. T stanični receptor prepoznaje peptid smješten u žlijeb HLA molekule (Abbas i sur., 2018.).

Naivni limfociti T recirkuliraju kroz limfne čvorove i u njima se susreću sa stanicama koje predočuju antigene. Aktiviraju se samo oni naivni limfociti T koji uspiju prepoznati specifični peptid smješten u žlijebu molekule HLA, kao i izvršni limfociti T koji su nastali tijekom prethodnog susreta s takvim peptidom. Za aktivaciju limfocita T dovoljan je vrlo mali broj kompleksa stranog peptida u žlijebu molekule HLA čak i ako je većina molekula HLA u svojem žlijebu zasićena vlastitim peptidima. Molekule HLA vežu i vlastite i strane peptide, a limfociti T onda pretražuju te predočene peptide i pronalaze strane peptide. U zdravom organizmu ne dolazi do pojave autoimunosti jer limfociti T koji prepoznaju komplekse vlastitih peptida u žlijebu molekula HLA bivaju uništeni.

Predočavanje stranih peptida limfocitima T nužno je za aktiviranje odnosno sazrijevanje CD4+ i CD8+ limfocita T i usmjeravanje imunološke reakcije u smjeru proizvodnje protutijela ili reakcije citotoksičnosti. Antigeni HLA razreda I izraženi su na svim stanicama s jezgrom i mogu vezati i predočavati peptide virusa ili tumorski promijenjenih stanica CD8+ citotoksičnim limfocitima T. Oni zatim uništavaju stanice zaražene virusom ili tumorske stanice koje izražavaju tumorske antigene. Antigeni HLA razreda II izraženi su na profesionalnim stanicama

koje predočuju antigen (limfociti B, makrofagi, dendritičke stanice) i koje su odgovorne za predočavanje izvanstaničnih mikroorganizama (antigena) CD4+ pomagačkim limfocitima T. Nakon prepoznavanja antigena ovi limfociti T pomažu limfocitima B u stvaranju protutijela i aktivaciji makrofaga koji fagocitiraju izvanstanične mikroorganizme obložene protutijelima (Bodmer i sur., 1987., Abbas i sur., 2018.).

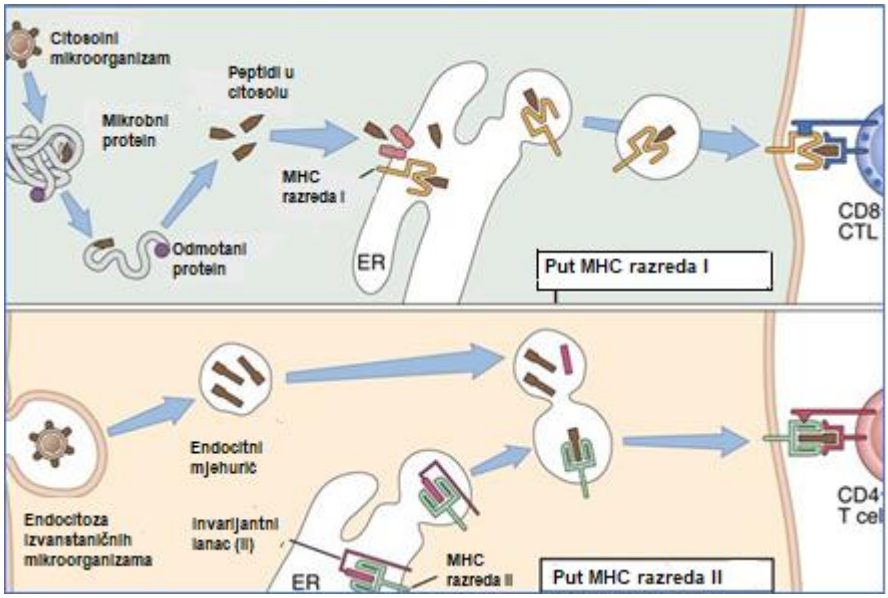
2.1.2.8. Preradba i predočavanje antigena

HLA molekule imaju širu specifičnost u odnosu na receptore na limfocitima T. To znači da jedna molekula HLA u svoj žlijeb može smjestiti različite peptide, ali je uočeno da u žlijebu odjednom može biti samo jedan peptid (Bjorkman i sur., 1987.). Antigenski receptori limfocita T prepoznaju i peptid i molekulu HLA (Slika 8). Razlike u redoslijedu aminokiselina peptida u žlijebu molekule HLA utječu na prepoznavanje određenog peptida limfocitima T, odnosno mogu povećati imunogeničnost nekog peptida. Radi se o spregnutosti između limfocita T i molekula HLA u prepoznavanju peptida ili restrikciji molekulama HLA (Zinkernagel i Doherty, 1974.).

Prerada citosolnih bjelančevina odvija se u proteazomima, a nakon prerade peptidi se u endoplazmatskom retikulumu dodatno skraćuju i vežu u žlijeb molekula HLA razreda I. Stabilni kompleksi peptida i molekula HLA razreda I dalje putuju kroz Golgijev aparat i prenose se na površinu stanice u egzocitoznim vezikulama. Tamo ih prepoznaju CD8+ limfociti T čija se koreceptorska molekula CD8 veže za nepolimorfni dio molekule HLA razreda I ($\alpha 3$ i $\beta_2 m$). Izvor citosolnih bjelančevina produkti su virusa, bakterija ili drugih unutarstaničnih mikroorganizama, a u tumorskim stanicama su produkti promijenjenih, mutiranih ili prekomjerno izraženih gena (Kloetzel, 2001., Antoniou i sur., 2003., Sant i Yewdell, 2003., Yewdell, 2005., Jensen, 2007.).

Izvanstanične bjelančevine prvo se moraju internalizirati, to jest endocitozom biti uvučene u endosome profesionalnih stanica koje predočuju antigene. Dendritične stanice i makrofagi imaju receptore za prepoznavanje zajedničke strukture mikroorganizama, sami makrofagi imaju i receptore za ulomak Fc protutijela i C3 komponente komplementa, a limfociti B imunoglobulin kojim vežu slobodne bjelančevine. U endosomima dolazi do prerade izvanstaničnih bjelančevina u peptide. U endoplazmatskom retikulumu sintetizira se molekula HLA razreda II i u žlijeb, u koji će se kasnije vezati peptid, veže se invarijantni lanac Ir čime se onemogućuje vezanje peptida u taj žlijeb, a peptidi koji se nađu u endoplazmatskom

retikulumu, vezat će se za molekule HLA razreda I. Molekule HLA razreda II s invarijantnim lancem iz Golgijevog aparata izlaze u egzocitne vezikule i u njima putuju do endocitnih vezikula gdje se nalaze prerađeni peptidi. Tu se uklanja invarijantni lanac i dolazi do vezanja specifičnog peptida u žlijeb HLA razreda II. Tako stabilizirani kompleks izražava se na površini stanice gdje ga prepoznaje CD4+ limfocit T zajedno s ko-stimulacijskom molekulom CD4 vezanom za nepolimorfni dio molekule HLA razreda II (α_2 i β_2) (Kleijmeer i sur., 2001., Bryant i Ploegh, 2004., Vyas i sur., 2008.) (Slika 9).



Slika 9. Prerada i predočavanje citosolnih antigena putem molekula HLA razreda I i izvanstaničnih antigena putem molekula HLA razreda II (preuzeto i prilagođeno iz Abbas i sur., 2018.).

Neke dendritične stanice imaju sposobnost križnog predočavanja (engl. *cross-presentation*) odnosno mogu predočiti antigene porijeklom iz druge stanice - zaražene virusom ili tumorski promijenjene. Antigen uvučen endocitozom u endosome ide putem sklapanja s molekulama HLA razreda II, ali istovremeno ulazi i u citosolni put i u endoplazmatski retikulum i dalje se sklapa s molekulama HLA razreda I (Joffre i sur., 2012.).

2.2. IMUNOTOLERANCIJA I AUTOIMUNOST

Imunološka reakcija organizma na neki antigen rezultirat će pojavom imunizacije tj. imunosti na taj antigen. Prvi susret s antigenom uzrokuje primarnu imunizaciju, a svaki slijedeći

sekundarnu ili anamnestičku reakciju. Antigeni na koje organizam reagira mogu biti strani ili vlastiti. Ako organizam ne reagira pri susretu s antigenom, smatra se da je razvio toleranciju na taj antigen. Normalno je da organizam ima toleranciju na vlastite antigene, ali u određenim stanjima/bolestima dolazi do gubitka tolerancije na vlastito i do razvoja autoimunosti. Točni mehanizmi nastanka autoimunosti samo su djelomično razjašnjeni i predmet su brojnih istraživanja (Zanelli i sur., 2000.).

Tolerancija na vlastite antigene široko je rasprostranjena u ljudskom organizmu. Središnja tolerancija razvija se u nezrelim autoreaktivnim klonovima u generativnim limfnim organima: za limfocite T u timusu (Sprent i Kishimoto, 2002.), a za limfocite B u koštanoj srži. Strani antigeni ne završavaju u središnjim limfnim organima nego u perifernim limfnim čvorovima, slezeni i limfnom tkivu sluznica. Nezreli limfociti T i B koji visokim afinitetom prepoznaju vlastite antigene budu uništeni apoptozom (Griffith i Ferguson, 2011.).

2.2.1. Središnja tolerancija limfocita T

Nezrele stanice T u timusu susreću samo vlastite antigene, koji cirkuliraju između tkiva. Antigeni vlastitih perifernih tkiva u timusu budu prepoznati uz pomoć bjelančevine autoimunog regulatora (AIRE). Mutacije gena za AIRE dovode do razvoja multiorganske autoimune bolesti (autoimuni poliendokrini sindrom tipa 1, APS1) (Teh i sur., 2010.).

Unutarnji put apoptoze odvija se uz pomoć bjelančevina iz porodice Bcl-2. Te bjelančevine aktiviraju se kao rezultat oštećenja DNA ili signalima koje vlastiti antigeni preko receptora šalju nezrelim limfocitima. Kada do stanica ne dolaze signali za preživljavanje, mitohondriji postaju propusni i iz njih istječu molekule među kojima i citokrom C koji u citosolu kaskadno aktivira citosolne enzime kaspaze. To dovodi do fragmentacije DNA i apoptoze stanice (Hildeman i sur., 2002.).

Vanjski put apoptoze stanice započinje vezanjem bjelančevina (Fas-liganda) za receptor na staničnoj membrani (Fas receptor), sličan receptoru za čimbenik nekroze tumora (TNF, engl. *tumor necrosis factor*). Fas receptori aktiviraju pojedine bjelančevine koje kaskadno aktiviraju citosolne kaspaze što dovodi do apoptoze stanice. Tijekom apoptoze na membrani stanice dolazi do izlaganja apoptotskih tjelešaca i lipida fosfatidil-serina, obično smještenog s unutarnje strane stanične membrane. Njih prepoznaju makrofagi koji fagocitiraju takve stanice, a zahvaljujući njihovom uklanjanju spriječavaju razvoj upalnog odgovora (Wajant, 2002.). U miševa kojima su genetski oštećena oba puta apoptoze dolazi do razvoja sistemskih autoimunih

bolesti (Cruz i sur., 2016.). U djece kod kojih postoje mutacije na genu koji kodira Fas dolazi do razvoja autoimunog limfoproliferativnog sindroma (Straus i sur., 1999.).

2.2.2. Periferna tolerancija limfocita T

Zrele CD4+ stanice T izložene antigenu preko staničnog receptora T (TCR, engl. *T-cell receptor*), ali bez kostimulacijskog signala molekulama B7-1 i B7-2 preko CD28, neće reagirati s antigenom, tj. bit će funkcionalno neosjetljive, anergične (Greenwald i sur., 2001.). Dio stanica T iz timusa odlazi u periferna tkiva i tamo sudjeluje u imunološkoj toleranciji preko inhibitornih recepora CTLA-4 i PD-1 (Nishimura i sur., 1999., Walker i Sansom, 2011.).

Receptor CTLA-4 djeluje inhibitorno na naivne stanice T blokiranjem signala (aktivira fosfatazu koja uklanja fosfate iz signalnih molekula T staničnog receptora) i smanjuje raspoloživost B7 (veže se za B7 na antigen prezentirajućim stanicama i blokira njihovo vezanje za CD28). Funkcija inhibitornog receptora CTLA-4 korištena je u terapiji tumora lijekovima koji blokiraju učinak CTLA-4, što je dovelo do pojačanog imunološkog odgovora na tumore, ali i rezultiralo većom pojavom autoimunih bolesti s upalama različitih organa npr. encefalomijelitisom i dijabetesom (Tivol i sur., 1995., Luhder i sur., 2000., Vijayakrishnan i sur., 2004.).

Dio preživjelih limfocita T iz timusa razvija se u regulacijske CD4+ limfocite T koji potiskuju imunosni odgovor i održavaju toleranciju na vlastito. Većina regulacijskih CD4+ limfocita T izražava molekule CD25 receptora za interleukin 2 (IL-2). Transkripcijski čimbenik FoxP3 je ključan za razvoj većine CD25+ regulacijskih limfocita T, a njegova mutacija ili nedostatak rezultira multisistemskim autoimunim bolestima, primjer je IPEX (imunosna disregulacija, poliendokrinopatija i enteropatija, vezana uz kromosom X). Regulacijski FoxP3+ limfociti T obično izražavaju i velike količine CTLA-4 (Takahashi i sur., 2000.).

Timusni regulacijski limfociti T nastali u timusu (tTreg), prepoznaju vlastite antigene i zovu se prirodni regulacijski limfociti. U perifernim limfnim organima razvijaju se periferni regulacijski limfociti T (pTreg) iz naivnih CD4+ limfocita T nakon izlaganja antigenu. To su adaptabilni ili inducibilni regulacijski limfociti T i oni mogu prepoznati i vlastite i strane antigene (Hsieh i sur., 2004., Pacholczyk i sur., 2006., Lathrop i sur., 2011., Hsieh i sur., 2012., Yadav i sur., 2013., Pohar i sur., 2018.,).

Miševi kojima nedostaje gen za IL-1 nemaju regulacijskih CD25+ FoxP3+ limfocita T, a stvaraju antieritrocitna autoprotutijela i anti-DNA protutijela te razvijaju upalne bolesti crijeva te autoimunu hemolitičku anemiju (Ahmad i sur., 2011., Isakson i sur., 2012.).

Regulacijski limfociti T, kao i dendritične stanice te makrofagi luče interleukin 10 (IL-10) koji sudjeluje u regulaciji imunološke reakcije. IL-10 koči proizvodnju interleukina 12 (IL-12) koji ima ulogu u imunološkim reakcijama protiv unutarstaničnih mikroorganizama. Osim toga IL-10 koči i izražavanje kostimulacijskih molekula te molekula HLA II na dendritičnim stanicama i makrofagima i tako onemogućava aktivaciju limfocita T i prekida staničnu imunološku reakciju (Bilate i Lafaille, 2012.).

Epstein-Barrov virus (EBV) sadrži gen homologan ljudskom genu za IL-10, koji ima jednak učinak kao ljudski IL-10 tj. koči imunološku reakciju što virusu omogućava bolje preživljavanje (Jog i sur., 2018.)

2.2.3. Središnja tolerancija limfocita B

Limfociti B ne smiju reagirati s vlastitim antigenima neovisnim o timusu - polisaharidima i lipidima, kao ni s vlastitim bjelančevinastim antigenima. Kada u koštanoj srži prepoznaju vlastite antigene, jakim afinitetom dolazi do preuređivanja membranskog receptora limfocita B na novu specifičnost ili do njihovog odumiranja apoptozom. Za antigene koje limfociti B u koštanoj srži vežu niskim afinitetom, limfociti B postaju funkcionalno neosjetljivi ili anergični (Nemazee, 2017.).

Preuređivanje staničnog receptora B moglo bi imati ulogu u patogenezi autoimunih bolesti, ali su dosadašnje studije provedene na životinjskim modelima i na ljudima rezultirale oprečnim zaključcima. Studije na životinjskim modelima sugeriraju porast preuređivanja teških lanaca i smanjenje u preuređivanju lakih lanaca protutijela u autoimunosti. Druga istraživanja pokazuju da bi smanjeno preuređivanje membranskog staničnog receptora B u koštanoj srži tijekom sazrijevanja limfocita B, nedovoljno uklanjalo autoreaktivna protutijela, što bi kasnijim preuređivanjem na periferiji nekontrolirano stvaralo širi repertoar autoprotutijela (Verkoczy i sur., 2004., Yurasov i sur., 2005., Lamoureux i sur., 2007., Liu Y i sur., 2007., Luning Prak i sur., 2011., Meffre, 2011., Meng i sur., 2012., Clark i sur., 2013. Henry-Bonami i sur., 2013.).

2.2.4. Periferna tolerancija limfocita B

Zreli limfociti B koji na periferiji susretnu vlastite antigene neće ih prepoznati ukoliko im nisu predočeni antigen prezentirajućim stanicama uz pomoć specifičnih pomagačkih limfocita T.

Dio limfocita B postat će tolerantan na ponavljano podraživanje vlastitim antigenima, ali zbog ovisnosti o čimbenicima rasta, takve stanice žive kraće i brže se uklanjaju iz cirkulacije mitohondrijskim putem. Oni limfociti B koji vlastite antigene na periferiji vežu niskim afinitetom mogu biti regulirani inhibitornim receptorima. U slučaju genetskih grešaka na inhibitornim receptorima može doći do razvoja imunosti kao što se to pokazalo na životinjskom modelu (Pritchard i Smith, 2003.).

2.2.5. Mehanizmi autoimunosti

Paul Ehrlich i Julius Morgenroth su 1900. jasno opisali razliku opaženu u svojim istraživanjima na eksperimentalnim životinjama između „izolizina“ sposobnih uništiti stanice životinja iste vrste i „autolizina“ sposobnih lizirati vlastite stanice eksperimentalnih životinja (koza kao modelni organizam) (Ehrlich i Morgenroth, 1900.). Shvatili su da organizam traži način kako regulirati tvorevine stvorene vlastititim stanicama, te da je imunološki sustav jedinke spriječen u djelovanju protiv vlastitih elemenata stvaranjem autotoksina i tada uvode izraz „horror autotoxicus“ (Ehrlich, 1904.).

Autoimunost nastaje kao rezultat širenja autoimunog odgovora organizma, a može biti rezultat različitih mehanizama i uključuje sve aspekte imunološkog odgovora: prekid središnje i/ili periferne tolerancije na vlastito i pojačano izlaganje vlastitih antigena zbog staničnog stresa ili ozljede. Klinički se autoimune bolesti najčešće dijele na autoimune bolesti specifične za pojedini organ (štitnjača, nadbubrežna žlijezda, želudac, gušterača) i sistemske autoimune bolesti koje pogađaju više tkiva (reumatske bolesti koje uključuju kožu, bubreg, zglobove i mišiće). Oba klinička oblika autoimunih bolesti u pravilu postaju kronične bolesti jer su autoantigeni stalno prisutni u organizmu. Slijedeća podjela autoimunih bolesti temelji se na osnovnom patogenetskom mehanizmu: autoimunost nastala djelovanjem protutijela na staničnu membranu ili stanične strukture (autoimuna hemolitička anemija, autoimuna trombocitopenična purpura, Goodpasture sindrom, pemphigus vulgaris, akutna reumatska groznica, Gravesova bolest, Hashimotov tiroiditis, mijastenija gravis), bolesti imunih kompleksa (sistemski eritemski lupus) i autoimunost uzrokovana autoreaktivnim limfocitima T

(diabetes tipa 1, reumatoidni artritis, multipla skleroza, upalne bolesti crijeva, psorijaza) (Murphey 2012.).

Prepoznati čimbenici koji pridonose razvoju autoimunosti su razni geni (Voight i Cotsapas, 2012.) povezani sa sklonošću razvoju autoimunosti, mikroorganizmi (Ebringer i sur., 1978., Granfors i Toivanen, 1986., Ogasawara i sur., 1986., Schwimmbeck i sur., 1987., Husby i sur., 1989., Granfors i sur., 1990., Granfors i sur., 1992., Wilson i sur., 1995., Ahmadi i sur., 1998., Cobb i sur., 2004., Söderberg-Nauclér, 2012.), aditivi u hrani (Lerner i Matthias, 2015.), promjene u mikrobiomu (De Luca i Shoenfeld, 2019., Dehner i sur., 2019.), hormoni (Moulton, 2018.) te kronična upala (Franks i Slansky, 2012.).

Cjelogenomska asocijacijska istraživanja (GWAS, engl. *Genome-Wide Association Studies*) omogućila su uvid u povezanost autoimunih bolesti s velikim brojem polimorfizama gena, koji, uz ostale prepoznate čimbenike, dovode do bolesti. Otkrivene su stotine različitih genskih lokusa. Isti genski polimorfizmi postoje i u zdravih osoba, ali sa smanjenom učestalošću u odnosu na osobe s autoimunim bolestima. Dva su temeljna pristupa istraživanjima: prvi- proučavanje individualnih alela, gena i proteina, te drugi- proučavanje skupina rizičnih alela s ciljem otkrivanja puteva djelovanja tih gena/alela (Hu i Daly, 2012.). Snažna povezanost autoimunih bolesti uočena je u genima HLA (Bodmer, 1980., Matzaraki i sur., 2017.). Osim polimorfizama HLA gena, postoji čitav niz polimorfizama ne-HLA gena koji se povezuju s autoimunim bolestima. S nastankom upalnih bolesti crijeva povezuju se polimorfizmi gena uključenih u imunološku regulaciju: PTPN22 (gen za proteinsku tirozinsku fosfatazu), IL23R (sastavnica receptora za IL-23, ima ulogu u stvaranju i održavanju Th17 stanica), IL10 (smanjuje izražaj kostimulatora, potiskuje odgovor Th1), IL2/IL21 (čimbenici rasta i diferencijacije stanica T), IL21B (potiče Th1 i Th17) te polimorfizmi gena uključenih u odgovore na mikroorganizme: NOD2 (citoplazmatski receptor bakterijskih peptidoglikana) i ATG16 (autofagija). I za druge autoimune bolesti otkriveni su, te se i dalje otkrivaju ne-HLA geni (Zenewicz i sur., 2010.).

2.3. POVEZANOST SUSTAVA HLA S AUTOIMUNIM BOLESTIMA

HLA sustav preko kontrole površinskih antigena i imunološke uloge, te zbog velikog broja polimorfizama, uzrokuje izniman broj povezanosti s bolestima. Većina tih povezanosti uključuje autoimune ili barem imunološki vezane učinke (Bodmer, 1980.). Brojni su dokazi da je imunološki sustav tijekom ljudske povijesti zbog svoje glavne uloge, a to je zaštita organizma

od patogena, prošao prirodnu selekciju kroz brojne susrete s mikroorganizmima. Tako je evolucijsko usko grlo omogućilo razvoj i očuvanje određenih HLA genotipova i haplotipova, osobito DR/DQ koji aktivacijom limfocita T omogućuju sekreciju odgovarajućih citokina radi razrješavanja infekcija (Bodmer,1972., Gough i Simmonds, 2007.). Isti genotipovi/haplotipovi prezentiraju i vlastite peptide uzrokujući molekularnu mimikriju i aktivaciju proinflamatornih citokina koji uzrokuju autoimune bolesti (Ogasawara i sur., 1986.). Tijekom infekcije dolazi do različite lokalizacije patogenih bakterija: jedan dio bakterija završava unutar stanica (npr. *Mycobacterium tuberculosis, Leishmania major, Cryptosporidium parvum*), dok druge bakterije (npr. *Borrelia burgdorferi, Klebsiella pneumoniae*) i neki drugi patogeni (npr. *Candida albicans*) ostaju izvan stanica. Upravo lokalizacija patogena određuje koja podvrsta CD4+ limfocita T će sudjelovati u imunološkoj reakciji. Th1 limfociti izlučuju interferon γ (IFN- γ), suprimiraju Th2 i Th17 limfocite i aktiviraju prirodno-ubilačke stanice (engl. *natural killer*, NK), makrofage i CD8+ limfocite T i tako pridonose uklanjanju mikroorganizama iz organizma. Patogene koji ostaju izvan stanica uništavaju Th17 limfocite koje luče interleukin 17 (IL-17), a on privlači neutrofile u tkivo zahvaćeno infekcijom. IL-17 potiče lučenje brojnih medijatora upale i kemokina i učinkovito pomaže limfocitima B, te posljedično potiče prizvodnju protutijela i prekapčanje izotipova protutijela (Fernando i sur., 2008., Korn i sur., 2009., Mangalam i sur., 2013.).

Prva istraživanja rađena su serološkim metodama, a kasnije i molekularnim metodama, koje su omogućile veću razlučivost pojedinih alela i preciznije zaključke o povezanosti predisponirajućih i/ili protektivnih alela s autoimunim bolestima (Bodmer, 1987.).

Obzirom na prethodno opisane osnove razvoja autoimunosti, u iste jedinke se može pojaviti i nekoliko autoimunih bolesti istovremeno ili u nekom vremenskom periodu. Ponekad upravo autoimune bolesti kao znak poremećaja regulacije imunotolerancije mogu ukazivati na usporedni razvoj drugih bolesti koje potiču imunološki sustav organizma na odgovor kao što je kronična upala i razvoj tumora (Franks i Slansky, 2012.).

Istraživanja pokazuju najjaču povezanost alela DRB1*04:01 i DRB1*04:04 s reumatoidnim artritisom u populaciji sjeverne Europe i Engleske (Toussirot i sur., 1999., Mattey i sur., 2001.), DRB1*01:01 u južnoj Francuskoj (Benazet i sur., 1995.) i Hrvatskoj (Laktašić Žerjavić i sur., 2005.) te DRB1*04:05 u Španjolskoj (Yelamos i sur., 1993.). To su sve aleli zajedničkog epitopa i povezuju se s destruktivnijim oblikom bolesti, ali oko 25% nositelja ovih alela nemaju

reumatoidni artritis pa se na temelju alela bolest ne može predvidjeti niti isključiti (Mu i sur., 1999).

U inzulin-ovisnoj šećernoj bolesti pronađena je snažna povezanost s haplotipom DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02, alelima DRB1*04:01 i DRB1*04:02, te haplotipom DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (Erlich i sur., 2008.), ali zbog nekoliko udruženih bolesti koje se javljaju zajedno u istog bolesnika i velike polimorfnosti sustava HLA često je teško zaključiti koji je gen najzaslužniji za nastanak bolesti. Za alel DQB1*06:02 uočen je protektivni učinak (Grubić, 2019.). Od alela HLA razreda I za podložnost inzulin ovisnoj šećernoj bolesti otkriveni su B*18:01, B*39:06, B*44:03, C*03:03, C*08:02 i C*16:01 (Valdes i sur., 2005.), a snažan protektivni učinak pokazao je alel B*57:01 (Noble i sur., 2010.). Za razliku od europske populacije gdje određeni haplotipovi povećavaju rizik od bolesti, u afričkoj i azijskoj populaciji ti isti haplotipovi djeluju zaštitno (Howson i sur., 2013., Noble, 2015.).

Za Gravesovu bolest se alel HLA-DRB1*03:01 navodi kao rizični (Zamani i sur., 2000.), a haplotip HLA-DRB1*07:01 ~ DQB1*02:02 kao zaštitni (Rojnić Putarek, 2015.), a od alela HLA razreda I alel HLA-C*07 je rizični, a HLA-C*03 i C*06 su zaštitni aleli (Simmonds i sur., 2007.). Za autoimuni tiroiditis u bolesnika u Hrvatskoj rizični je haplotip HLA-DRB1*04 ~ DQB1*03:02, a zaštitni HLA-DRB1*01 ~ DQB1*05:01 (Rojnić Putarek, 2015.).

U populaciji srednje i sjeverne Europe i središnje Hrvatske najčešći aleli rizični za celijakiju su DQA1*05:01 i DQB1*02 (DQ2) pa DQA1*03 i DQB1*03:02 (DQ8) (Margaritte-Jeanin i sur., 2004., Žunec i sur., 2004., Romanos i sur., 2009.), a u radu iz primorske Hrvatske izražen je i haplotip DQA1*02:01 i DQB1*02:02, zastupljen u mediteranskim zemljama (Mijandrušić Sinčić i sur., 2016.).

Rizični aleli za psorijazu tipa 1 (teži oblik s relapsima) su HLA-Cw*6, HLA-B*13, HLA-B*57, DRB1*0701/02, DQA1*02:01 i DQB1*03:03, a za psorijazu tipa 2 (blagi oblik) uključeni su HLA-Cw*2 i HLA-B*27, dok su HLA-Cw*6 i HLA-DR*7 tek blago povišeni, a DQB1*03:03 nije uočen (Muto i sur., 1995.). U Hrvatskoj je konzervirani haplotip psorijatičara bijele rase DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:01 češće zastupljen nego haplotip DRB1*07-DQA1*02:01- DQB1*03:03, koji je češći u Njemačkoj (Schmitt-Egenolf i sur., 1993., Kaštelan i sur., 2015.). Među hrvatskim bolesnicima najjaču povezanost imaju aleli HLA-B*39 i HLA-B*57, a HLA-B*13 i HLA-B*27 samo prije korekcije, dok je HLA-Cw*2 povišen samo zbog neravnoteže udruživanja s najzastupljenijim alelima (Grubić i sur., 2004.).

Alele HLA sustava razreda I i II, koji se povezuju s rizikom nastanka određene autoimune bolesti, kao i onih HLA alela koji pokazuju zaštitnu ulogu treba uvijek promatrati u kontekstu zemljopisnog položaja određene populacije. Istraživanja potvrđuju da aleli koji u jednoj populaciji nose rizik za razvoj neke autoimune bolesti, u nekoj drugoj populaciji mogu predstavljati zaštitne alele. To potvrđuje ulogu okoliša u očuvanju određenih alela i cijelih haplotipova na određenom zemljopisnom području.

2.3.1. Povezanost sustava HLA s autoimunom hemolitičkom anemijom (AIHA)

Istraživanja o povezanosti HLA sustava s autoimunom hemolitičkom anemijom objavljena su prije četrdesetak godina, a korištena metoda bila je serološka. Ispitivane skupine bile su male, a učestalost antigena HLA-A1, HLA-A7 i HLA-A8 nije se pokazala konzistentnom. Osim ovih antigena, povezanost je bila uočena za antigene HLA-A3, HLA-B8, HLA-BW6 i HLA-DRW3 (Clauvel i sur., 1974., Da Costa i sur., 1974., Toolis i sur., 1977., Abdel Khalik i sur., 1980., Gehrs i Friedberg, 2002.).

Prvo gensko istraživanje alela HLA razreda II, u Kaliforniji 1996., na malom uzorku DAT (direktni antiglobulinski test) pozitivnih zdravih davatelja i DAT-pozitivnih bolesnika pokazalo je smanjenu učestalost HLA-DQ6, dok na lokusu HLA-DR nije uočena razlika (Wang-Rodriguez i Rearden, 1996.).

Opisani su slučajevi AIHA u četvero djece uz pojavu autoimunog hepatitisa, bronhopneumonije uzrokovane bakterijom *Mycoplasma pneumoniae*, infektivne mononukleoze te nakon cijepljenja protiv difterije, polimijelitisa, pertusisa i tetanusa i moguća povezanost prolongiranog tijeka bolesti u 3 od 4 navedena slučaja s HLA DR2, a u slučaju AIHA s hepatitisom utvrđena je prisutnost i HLA B27 antigena (Čulić i sur., 1999.).

Japanski autori potvrdili su smanjenu učestalost HLA-DQ6 u skupini pacijenata s različitim autoimunim bolestima (sistemskim eritemskim lupusom, Bechetovom bolesti, idiopatskom trombocitpeničnom purpurom i drugim), a posebno alela DQB1*0602 (Nomura i sur., 1998.).

Kineski autori nisu pronašli značajnu povezanost DAT-pozitivnih pacijenata s HLA-DRB1 i HLA-DQB1 alelima. U podskupini pacijenata s C3d pozitivnim DAT-om uočili su veću učestalost alela HLA-DRB1*14 te nisu našli niti jednog pacijenta s alelom HLA-DRB1*13 (Lin i sur., 2017.).

U Ruskoj studiji s 24 bolesnika s AIHA, nađena je veća učestalost alela HLA-DRB1*03, alela HLA-DRB1*09 i alela HLA-DRB1*16 (Smirnova i sur., 2018.). Alel HLA-DRB1*09 češće je

zastupljen u azijskoj populaciji i vrlo rijedak u europskoj populaciji. Aleli HLA-DRB1*11 i HLA-DRB1*15 bili su češće zastupljeni u kontrolnoj skupini (Smirnova i sur., 2018.).

2.3.2. Povezanost sustava HLA s antieritrocitnim aloprotutijelima

U posljednjih desetak godina raste interes za ispitivanjem povezanosti alela sustava HLA s rizikom ili zaštitnom ulogom u aloimunizaciji na eritrocitne antigene. Osobe koje su, nakon transfuzije, razvile antieritrocitna aloprotutijela češće razvijaju i autoprotutijela (Garraty, 2004., Young i sur., 2004., Ahrens i sur., 2007.), a više od 65 % bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom i anemijom srpastih stanica ima uz aloprotutijela i autoprotutijela (Nickel i sur., 2015., Singhal i sur., 2017.). Najčešće je kao rizičan alel za razvoj antieritrocitnih aloprotutijela na Fy^a antigen u Europi otkriven HLA-DRB1*15 (Picard i sur., 2009., Schoenwille i sur., 2014., Verduin i sur., 2016., Maluskova i sur., 2017., Raos i sur., 2019.), a slijedeći alel DRB1*04 (Noizat-Pirenne i sur., 2006., Raos i sur., 2019.). Za aloprotutijela na Jk^a antigen kao rizični aleli navode se DRB1*01:01, DRB1* 01:02, DRB1*10:01 (Reviron i sur., 2005.). Povećanu učestalost alela DRB1*09 u aloimunizaciji na E antigen nalazi grupa autora iz Nizozemske (Schoenwille i sur., 2014.), kao i autori iz Kine (Tian i sur., 2018.). U pacijenata koji su stvorili aloprotutijela na eritrocitni antigen S, Nizozemci su našli veću učestalost alela DRB1*07 (Schoenwille i sur., 2014.). Zaštitu od razvoja aloprotutijela na eritrocitne antigene mogli bi predstavljati aleli lokusa DQB1*02 (Tatari-Calderone i sur., 2016., Raos i sur., 2019.) i DQB1*03 i DQB1*05 (Tatari-Calderone i sur., 2016.).

2.4. UČESTALOST ALELA POJEDINIH LOKUSA HLA

U Tablici 1. i Tablici 2. prikazana je učestalost alela HLA razreda I, lokusa HLA-A, B i C, u populaciji Amerikanaca istočno-europskog podrijetla (AIEP, N=1116) (Mack i sur., 2009.), a za lokuse HLA-A i HLA-B prikazana je usporedba s dostupnim rezultatima testiranja u hrvatskoj populaciji (HRP, N=8000) (Grubić i sur., 2014.). Učestalost alela lokusa HLA-C u populaciji Amerikanaca istočno-europskog podrijetla (AIEP, N=1116) prikazana je u Tablici 3. Za učestalost alela lokusa DRB1 prikazani su podaci molekularnog testiranja za populaciju Amerikanaca istočno-europskog podrijetla (Mack i sur., 2009.) (AIEP, N=1116) i hrvatsku populaciju (HP, N=210) (Grubić i sur., 2000.) u Tablici 4. Za alele lokusa DQA1 prikazani su podaci molekularnog testiranja u hrvatskoj populaciji (HP, N=210) (Grubić i sur., 2000.) i u populaciji Amerikanaca europskog podrijetla (Klitz i sur., 2003.) (AEP, N=3798) u Tablici 5.

Za alele lokusa DQB1 prikazani su podaci molekularnog testiranja u hrvatskoj populaciji (HP, N=210) (Grubić i sur., 2000.) i u populaciji Amerikanaca europskog podrijetla (Klitz i sur., 2003.) (AEP, N=3798) u Tablici 6. Učestalost najčešćih haplotipskih sveza HLA-DRB1-DQA1-DQB1 u populaciji Amerikanaca europskog podrijetla (Klitz i sur., 2003.) (AEP, N=3798) i haplotipova u općoj hrvatskoj populaciji (Grubić i sur., 1995.) (OHP, N=236) prikazana je u Tablici 7.

Tablica 1. Učestalost alela lokusa HLA-A u populaciji Amerikanaca istočno-europskog podrijetla (AIEP, N=1116) i u hrvatskoj populaciji (HRP, N=8000) iz registra dobrovoljnih darivatelja koštane srži

Aleli lokusa HLA-A	HRP, %	AIEP, %
*A*01*	12,4	14,2
*A*02*	31,3	29,6
*A*03*	12,4	13,6
*A*11*	6,9	6,4
*A*23*	2,5	1,8
*A*24*	11,4	10,3
*A*25*	3,1	2,7
*A*26*	4,8	4,1
*A*29*	0,9	2,6
*A*30*	1,7	1,9
*A*31*	2,3	2,4
*A*32*	3,9	3,0
*A*33*	2,1	1,7
*A*66*	0,4	0,6
*A*68*	4,6	4,1
*A*80*	0,07	-

Tablica 2. Učestalost alela lokusa HLA-B u populaciji Amerikanaca istočno-europskog podrijetla (AIEP, N=1116) i u hrvatskoj populaciji (HRP, N=8000) iz registra dobrovoljnih darivatelja koštane srži

Aleli lokusa HLA-B	HRP, %	AIEP, %
*B*07*	7,1	11,0
B*08	7,8	9,1
*B*13*	3,8	3,1
*B*14*	2,5	3,3
*B*15*	4,8	7,6
*B*18*	8,2	5,6
*B*27*	6,2	4,9
*B*35*	13,9	12,4
*B*37*	0,9	1,5
*B*38*	4,4	2,6
*B*39*	3,1	4,9
*B*40*	3,8	6,6
*B*41*	0,9	1,0
*B*44*	9,3	11,2
*B*47*	1,4	0,4
*B*48*	1,4	0,3
*B*49*	1,9	3,0
*B*50*	1,5	1,3
*B*51*	11,4	5,5
*B*52*	1,5	0,8
*B*53*	0,7	0,3
*B*54*	0,03	-
*B*55*	1,3	1,6
*B*56*	1,0	0,7
*B*57*	2,7	2,9
*B*58*	1,1	0,9

Aleli *B*8* i *B*57* su istaknuti radi kasnije usporedbe s rezultatima

Tablica 3. Učestalost alela lokusa HLA-C u populaciji Amerikanaca istočno-europskog podrijetla (AIEP, N=1116)

Aleli lokusa HLA-C	**AIEP, %**
*C*01*	3,7
*C*02*	5,8
*C*03*	12,1
*C*04*	13,2
*C*05*	5,6
*C*06*	9,8
*C*07*	29,8
*C*08*	3,4
*C*12*	7,8
*C*13*	-
*C*14*	1,6
*C*15*	2,4
*C*16*	3,8
*C*17*	1,0

Tablica 4. Učestalost alela HLA-DRB1 lokusa u populaciji Amerikanaca istočno-europskog podrijetla (AIEP, N=1116) i hrvatskoj populaciji iz registra dobrovoljnih darivatelja koštane srži (HRP, N=8000)

Aleli lokusa HLA-DRB1	**HRP, %**	**AIEP, %**	**Aleli lokusa HLA-DRB1**	**HRP, %**	**AIEP, %**
*DRB1*01:01*	10,7	9,3	*DRB1*11:03*	-	0,4
*DRB1*01:02*	1,2	1,7	*DRB1*11:04*	8,1	5,8
*DRB1*01:03*	-	0,9	*DRB1*11:11*	-	-
*DRB1*03:01*	8,3	10,2	*DRB1*11:12*	-	-
*DRB1*04:01*	4,0	6,8	*DRB1*11:13*	-	-
*DRB1*04:02*	2,6	1,3	*DRB1*12:01*	1,4	1,3
*DRB1*04:03*	2,4	0,9	*DRB1*13:01*	5,5	6,6
*DRB1*04:04*	0,5	4,0	*DRB1*13:02*	5,2	4,5
*DRB1*04:05*	-	0,6	*DRB1*13:03*	2,1	1,9
*DRB1*04:07*	0,2	1,0	*DRB1*13:05*	-	0,4
*DRB1*07:01*	7,8	12,5	*DRB1*14:01*	3,8	1,4
*DRB1*08:01*	3,3	2,7	*DRB1*14:05*	-	-
*DRB1*08:03*	0,2	0,3	*DRB1*14:08*	-	-
*DRB1*08:04*	0,2	0,1	*DRB1*14:54*	-	-
*DRB1*08:12*	-	-	*DRB1*15:01*	10,0	11,0
*DRB1*09:01*	-	1,2	*DRB1*15:02*	1,0	0,9
*DRB1*10:01*	1,0	1,1	*DRB1*15:03*	-	0,2
*DRB1*11:01*	6,4	5,4	***DRB1*16:01***	**11,7**	**3,8**
*DRB1*11:02*	1,0	0,3	*DRB1*16:02*	0,7	0,2

Alel HLA-*DRB1*16:01* značajno odstupa između dviju populacija

Tablica 5. Učestalost HLA- DQA1 lokusa u općoj hrvatskoj populaciji (HP, N=210) i populaciji Amerikanaca europskog podrijetla (AEP, N=3798)

Aleli lokusa HLA-DQA1	**HP, %**	**AEP, %**
*DQA1*01:01*	15.7	10.8
*DQA1*01:02*	29.0	20.0
*DQA1*01:03*	6.2	6.4
*DQA1*01:04*	-	2.8
*DQA1*01:05*	-	-
*DQA1*02:01*	7.9	14.8
*DQA1*03:01*	10.0	10.0
*DQA1*03:02*		8.4
*DQA1*03:03*		-
*DQA1*04:01*	3.8	2.3
*DQA1*04:02*	-	-
*DQA1*05:01*	27.6	24.2
*DQA1*05:02*	-	-
*DQA1*05:03*	-	-
*DQA1*05:05*	-	-
*DQA1*06:01*	0.2	0.1

plavo - U HP za alel HLA-DQA1*03 dostupan je podatak samo za nisku rezoluciju

Tablica 6. Učestalosti alela DQB1 lokusa u općoj hrvatskoj populaciji (HP, N=210) i u populaciji Amerikanaca europskog podrijetla (AEP, N=3798)

Alel HLA-DQB1	HP, %	AEP, %
*DQB1*02:01*	15,7	13,2
*DQB1*02:02*		11,2
*DQB1*03:01*	22,1	17,8
*DQB1*03:02*	4,8	10,5
*DQB1*03:03*	-	**4,4**
*DQB1*03:04*	-	0,2
*DQB1*03:07*	-	-
*DQB1*03:19*	-	-
*DQB1*04:01*	3,6	-
*DQB1*04:02*	-	2,4
*DQB1*05:01*	13,1	11,6
*DQB1*05:02*	11,4	1,3
*DQB1*05:03*	4,0	2,1
*DQB1*06:01*	1,0	0,7
*DQB1*06:02*	11,0	14,3
*DQB1*06:03*	5,9	5,9
*DQB1*06:04*	4,5	3,4
*DQB1*06:09*	-	0,7

plavo - U OHP za alel HLA-DQB1*02 dostupan je podatak samo za nisku rezoluciju, crveno - naglašen podatak radi kasnije usporedbe s rezultatima

Tablica 7. Učestalost najčešćih haplotipskih sveza HLA-DRB1-DQA1-DQB1 u populaciji Amerikanaca europskog podrijetla (AEP, N= 3798) i haplotipova u općoj hrvatskoj populaciji (OHP, N=236)

DRB1-DQA1-DQB1	**AEP, %**	**OHP, %**	***DRB1-DQA1-DQB1***	**AEP, %**	**OHP, %**
01:01-01:01-05:01	9,05	8,90	*12:01-05:01-03:01*	1,08	1,27
01:02-01:01-05:01	1,38		*12:01-05:05-03:01*		
03:01-05:01-02:01	13,14	7,63	*13:01-01:03-06:03*	5,56	5,51
04:01-03:01-03:02	4,23	1,27	*13:02-01:02-06:04*	3,40	2,97
04:02-03:01-03:02	0,97	1,70	*13:02-01:02-06:09*	0,71	
04:04-03:01-03:02	3,90		*13:03-05:01-03:01*	0,74	1,27
07:01-02:01-02:01		7,20	*13:03-05:05-03:01*		
07:01-02:01-02:02	11,08		*14:01-01:04-05:03*	2,00	
07:01-02:01-03:03	3,66	1,27	*14:54-01:04-05:03*		
08:01-04:01-04:02	2,21		*15:01-01:02-06:02*	14,17	8,90
08:04-04:01-04:02	0,03		*15:02-01:03-06:01*	0,66	0,85
09:01-03:02-03:03	0,79		***16:01-01:02-05:02***	**0,95**	**9,32**
10:01-01:05-05:01			*16:02-01:02-05:02*	0,21	0,85
11:01-05:01-03:01	5,58	6,78			
11:01-05:05-03:01					
11:03-05:01-03:01	0,34	2,12			
11:03-05:05-03:01					
11:04-05:01-03:01	2,66	7,63			
11:04-05:05-03:01					

plavo - su označeni haplotipovi koji su u neravnoteži udruživanja, a bit će važni u raspravi, crno – je označen haplotip čija se učestalost značajno razlikuje između navedenih skupina

2.5. AUTOIMUNA HEMOLITIČKA ANEMIJA (AIHA)

2.5.1. Uvod

Osnovna zadaća eritrocita je prijenos kisika stanicama tkiva i organa. U trenutku kada prijenos kisika nije dovoljan, razvija se klinička slika anemije. Do anemije može doći naglo zbog krvarenja, smanjenog stvaranja eritrocita u koštanoj srži i ubrzane razgradnje eritrocita (hemoliza). Kod anemije koja se razvija polagano stignu se aktivirati mehanizmi kompenzacije, pa se organizam privikne na smanjenu količinu eritrocita tj. snižene vrijednosti hemoglobina. Primjer su kronična bubrežna bolest, kronične bolesti metabolizma, kronične upalne/autoimune bolesti, tumorske bolesti (hematološki tumori ili tumori ostalih organa), a takvo stanje može biti i posljedica djelovanja lijekova ili izloženosti kroničnim infekcijama ili toksinima. Mehanizmi koji dugotrajno prikrivaju kliničku sliku anemije nakon niza godina se iscrpljuju pa se tek tada javljaju simptomi anemije: bljedilo, umor, palpitacije, tahikardija. U anemiji kronične bolesti osim poremećaja metabolizma željeza i smanjenog odgovora koštane srži na eritropoetin, prisutna je i blaga hemolitička komponenta zbog hiperaktivnosti monocitno-makrofagnog sustava.

Ukoliko ubrzanu razgradnju eritrocita i njihov skraćen životni vijek uzrokuje imunološki odgovor organizma posredovan protutijelima, radi se o imunoj hemolitičkoj anemiji. Rjeđe se može raditi o anemiji uzrokovanoj neimunološkim mehanizmima, kao u slučaju unutarstaničnih oštećenja eritrocita zbog urođene hemoglobinopatije ili nedostatka pojedinih enzima.

Imuna hemolitička anemija je kliničko stanje u kojem protutijela, najčešće IgG i/ili IgM, rjeđe IgA razreda, uzrokuju ubrzanu razgradnju eritrocita vežući se za antigen na eritrocitnoj membrani uz aktivaciju retikuloendotelnog sustava i/ili sustava komplementa. Ovisno o tipu imunološkog odgovora, imuna hemolitička anemija može biti uzrokovana autoprotutijelima, aloprotutijelima ili potaknuta lijekovima (Gehrs i Friedberg, 2002.). Aloimuni odgovor najčešće je potaknut susretom sa stranim eritrocitnim antigenom tijekom transfuzije, trudnoće ili transplantacije.

U autoimunoj hemolizi eritrocita dolazi do stvaranja autoprotutijela usmjerenih na antigene zastupljene na eritrocitnoj membrani vlastitih eritrocita, koji se nalaze i na eritrocitima većine drugih osoba.

2.5.2. Epidemiologija

Autoimuna hemolitička anemija (AIHA) je rijetka bolest s godišnjom incidencijom od 1-3 na 100.000 (Gehrs i Friedberg, 2002.). Postoji nekoliko podjela AIHA (Tablica 8.). Prema temperaturnom optimumu antieritrocitnih autoprotutijela, AIHA dijelimo na toplu, hladnu i miješani tip AIHA. Incidencija tople AIHA (tAIHA) kreće se između 1:40.000 i 1:80.000 (Salama i sur., 2002.). U njoj dominiraju autoprotutijela razreda IgG, a rjeđe se nađu i razredi IgA i IgM. U manjeg broja bolesnika nije moguće dokazati o kojoj se vrsti protutijela radi (DAT negativna AIHA).

Kako je prikazano u Tablici 8., u odnosu na pridružene bolesti, AIHA može biti primarna (idiopatska) ili sekundarna (prethodi joj neka bolest) i pretežno je bolest odraslih iako se javlja i u djece s primarnim imunodeficijencijama i autoimunim limfoproliferativnim sindromom.

Većina bolesnika koji imaju tAIHA su žene (Dacie, 1992., Genty i sur., 2002., Salama i sur., 2002., Das i Chaudhary, 2009., Barcellini i sur., 2014., Kruhonja Galic i sur., 2020.). Godišnje se otkrije više od 70% novih slučajeva u pacijenata starijih od 40 godina života, s vršnom incidencijom između 60 i 70 godina (Pirofsky, 1968.).

U dječjoj dobi bolest se obično javlja nakon preboljele virusne infekcije i prolazi bez dodatnog liječenja.

U odraslih bolesnika AIHA je redovito ozbiljna i dugotrajna bolest, koja zahtjeva liječenje i može ugroziti život (Bass i sur., 2014.). Sekundarna AIHA je najčešće udružena s limfoproliferativnim poremećajima, reumatskim bolestima, nehematološkim malignim bolestima, kroničnim upalnim poremećajima, infekcijama te lijekovima (Evans i Weiser, 1957., Dausset i Colombani, 1959., Bell i sur., 1973., Sokol. i sur., 1981., Gehrs i Friedberg., 2002., Lechner i Jäger, 2010., Kruhonja Galic i sur., 2020.).

Pirofsky je opisao da 20% od 44 bolesnika s idiopatskom AIHA ima bliske srodnike s autoimunom bolesti (Pirofsky, 1968.). Lippman, Gehrs i Koti opisuju kliničke i laboratorijske autoimune manifestacije u srodnika osobe s AIHA (Lippman i sur., 1982., Gehrs i Friedberg., 2002., Koti i sur., 2013.), a simptomi AIHA mogu mjesecima ili godinama prethoditi prepoznavanju neke druge bolesti (Gehrs i Friedberg, 2002.).

Prirodna autoprotutijela razreda IgG su široko rasprostranjena u ljudskom serumu, a njihov broj podložan je promjenama zbog dobi, spola i pridruženih bolesti (Nagele i sur., 2013.).

Tablica 8. Podjela autoimunih hemolitičkih anemija i povezanost s bolestima

Topla AIHA – optimalna reaktivnost autoprotutijela na 37°C
Primarna ili idiopatska
Sekundarna:
povezana s limfoproliferativnim bolestima (npr. non-Hodgkin limfom, kronična limfocitna leukemija)
povezana s reumatskim bolestima (npr. sistemski eritemski lupus, SLE)
povezana s nehematološkim malignim bolestima (npr. tumor ovarija)
povezana s kroničnim upalnim bolestima (npr. ulcerativni kolitis)
potaknuta lijekom (npr. α-metildopa)
Hladna AIHA – optimalna reaktivnost autoprotutijela na <37°C
Sindrom hladnih aglutinina
Primaran ili idiopatski
Sekundarni:
poslije infekcije (npr. mikoplazma, infektivna mononukleoza, vodene kozice))
povezan s limfoproliferativnim poremećajima B stanica
Paroksizmalna hladna hemoglobinurija (Sindrom Donath-Landsteiner) – hladni hemolizini
Miješani tip AIHA – prisutnost toplih i hladnih autoprotutijela
Primarna ili idiopatska
Sekundarna:
često povezana s reumatskim bolestima (npr. SLE)
AIHA potaknuta lijekom – povezanost s oko 150 lijekova
AIHA ovisna o lijeku
apsorpcija haptena ili lijeka
formiranje imunih kompleksa
AIHA neovisna o lijeku

Tablica 8. je prilagođena prema izvornoj tablici u radu Bass i sur., 2014.

Antieritrocitna autoprotutijela razreda IgG ne uzrokuju uvijek hemolizu. Takva autoprotutijela nalaze se u bolesnika tijekom prijetransfuzijskog imunohematološkog ispitivanja (Worlledge,

978.), u trudnica (Hoppe i sur., 2001., Surucu i sur., 2015.), te u skupini zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi (Gorst i sur., 1980.).

2.5.3. Patogeneza

Bez obzira na vrstu AIHA, ona je redovito rezultat poremećene imunološke tolerancije. S obzirom na izrazitu složenost imunološke regulacije i dalje većinom nisu poznati mehanizmi koji dovode do sloma centralne i periferne tolerancije. Imunološka disregulacija proučavana je na animalnim mišjim modelima kada je bolest inducirana u prethodno zdravih jedinki te u miševa New Zealand Black, koji spontano razvijaju AIHA. Studije na bolesnicima s AIHA, kao i na mišjim modelima ukazuju na nedostatnu učinkovitost dendritičkih stanica u prezentaciji autoantigena te funkcijske poremećaje B i T limfocita (Naysmith i sur., 1981., Barker i sur., 1993., Mazza i sur., 1997.).

Stanice koje prezentiraju antigen uključujući dendritične stanice i makrofage hvataju vlastite antigene i prezentiraju ih autoreaktivnim limfocitima T inducirajući staničnu T-imunotoleranciju delecijom, apoptozom ili anergijom. U bolesnika s AIHA autoreaktivni limfociti T izbjegnu timusnu selekciju i ostaju na periferiji. U pacijenata s AIHA te stanice se mogu aktivirati *in vivo*, ali ne i u zdravih ispitanika (kontrolna skupina) (Barker i sur., 2007.). Mogući mehanizam kojim virusi i paraziti potiču stvaranje autoprotutijela je poliklonska aktivacija limfocita B superantigenima ili mitogenima. Stvaranje autoprotutijela u limfocitima B je mehanizam ovisan o limfocitima T. U nekih bolesnika s AIHA opažena je neravnoteža u stvaranju interleukina-12 (IL-12) i interleukina-10 (IL-10) u smislu pojačane proupalne aktivnosti te povećan broj limfocita Th17 i povišena razina njihovog produkta - proupalnog serumskog citokina IL-17 (Toriani-Terenzi i Fagiolo, 2005., Ward i sur., 2008., Graeber i Olsen, 2012.). Regulatorni limfociti T (Tregs) održavaju imunotoleranciju na vlastite antigene tako što se suprotstavljaju limfocitima Th17 (Noack i Miossec, 2014.). Istraživanje na malom broju bolesnika s AIHA pokazalo je značajno niži broj Tregs u usporedbi sa zdravim kontrolama (Ahmad i sur., 2011.). U drugim istraživanjima, bolesnici s AIHA imali su povećan broj limfocita Th17, odnosno povišene vrijednosti serumskog IL-17, što je koreliralo sa stupnjem anemije (Hall i sur., 2012.). Oksidativni stres s pretjeranim stvaranjem slobodnih kisikovih radikala uzrokuje ubrzanu ekstravaskularnu hemolizu u makrofagima jetre u miševa (Starzynski i sur., 2009.).

2.5.3.1. Autoprotutijela i komplement u patogenezi AIHA

Najčešći tip AIHA je topla AIHA (tAIHA) (75% svih slučajeva AIHA), a autoprotutijela su najčešće IgG razreda što ih usmjerava na ekstravaskularnu razgradnju ovisnu o stanicama u retikuloendotelnom sustavu. Eritrociti obloženi tim protutijelima vežu se za Fc receptor pretežno na makrofagima slezene (Dacie, 1992.). O podrazredu IgG autoprotutijela ovisi stupanj skraćenja vijeka eritrocita. Uobičajeno se nalaze autoprotutijela podrazreda IgG1 i zajedno s IgG3 značajno skraćuju životni vijek eritrocita, za razliku od IgG2 i IgG4, koji su u tome manje učinkoviti. Navedena autoprotutijela često su usmjerena na epitope iz Rh sustava: Rh kompleks (Salama i sur., 2002.) i na jednostavne antigene iz Rh sustava krvnih grupa kao što su e, E, C ili D (Gehrs i Friedberg, 2002.) te na membranski protein band 3, band 4.1 i glikoforin A kao univerzalne epitope na eritrocitima. Osim antieritrocitnih autoprotutijela, u 11 do 54% bolesnika razvijena su i antieritrocitna aloprotutijela (Chaplin, 1973., Petz i Garratty, 1980., Issitt i sur., 1996., Branch i Petz, 1999., Leger i Garratty, 1999., Gehrs i Friedberg, 2000., So i sur., 2000., Haspl i sur., 2001., Wheeler i sur., 2004., Das i Chaudhary, 2009., Park i sur., 2015.).

Autoprotutijela podrazreda IgG1 i IgG3 sposobna su aktivirati komplement, tako da se na eritrocitima uz njih mogu naći i komponente komplementa C3d. Autoprotutijela IgA razreda obično su povezana s IgG autoprotutijelima, ali izuzetno rijetko sama uzrokuju AIHA. Autoprotutijela razreda IgM odlično vežu komplement i mogu uzrokovati jaku intravaskularnu hemolizu. Ukoliko komplement nije aktiviran do litičkog kompleksa, tada na eritrocitu ostaje C3b komponenta koja omogućuje ekstravaskularnu razgradnju u jetri. Autoprotutijela razreda IgM često su usmjerena na I/i sustav i uzrokuju hladne AIHA (~20%) (Barcellini, 2015.). Raspon djelovanja IgM autoprotutijela je od 0 do 34°C, ali mogu biti aktivna i na 37°C i tada su izrazito štetna (brza intravaskularna hemoliza) s velikim izgledom smrtnog ishoda (20%). Donath-Lansteinerovo autoprotutijelo, bifazični hemolizin, veže komplement na periferiji tijela, a na 37°C uzrokuje lizu eritrocita. Usmjereno je na P antigen i uzrokuje paroksizmalnu hladnu hemoglobinuriju, koja se javlja obično u djece (30%), a rijetko u odraslih (<1% svih AIHA) (Berentsen 2002., Petz, 2004.). U oko 7-8% svih AIHA prisutna su i topla IgG autoprotutijela i hladna IgM u visokom titru (miješana AIHA). Postoje i atipični slučajevi AIHA, koji su uglavnom DAT negativni s učestalim teškim relapsima i nakon nekoliko linija liječenja i mogu imati smrtni ishod (Fattizzo, 2015.). Autoprotutijela u atipičnoj AIHA mogu

biti prolazno prisutna u serumu i u eluatu, a DAT je negativan zbog smanjene količine antigena na membrani vlastitih eritrocita, kao odgovora na hemolitični proces. Moguće je i da se radi o autoprotutijelima razreda IgM ili IgA koja ne aktiviraju komplement. I na kraju, vrlo rijetko DAT može biti pozitivan zbog lijekom potaknutih autoprotutijela. Podjela autoimunih hemolitičkih anemija prema komponentama može se vidjeti u Tablici 9.

2.5.4. Klinička slika tople AIHA

Bolesnik u primarnoj tAIHA (više od pola slučajeva tAIHA) obično razvija simptome tijekom nekoliko mjeseci, a rjeđe ima nagli početak bolesti sa simptomima teške anemije i žutice unutar svega nekoliko dana. U sekundarnoj tAIHA simptomi i znakovi AIHA mogu biti prikriveni kliničkom slikom osnovne bolesti. U primarnoj tAIHA s blagom anemijom ne mora biti ostalih znakova bolesti, čak i kod opsežnije razgradnje eritrocita i jače izražene anemije slezena ne mora biti značajno povećana. U potpuno izraženoj kliničkoj slici vrlo teške AIHA bolesnik ima vrućicu, bljedilo, žuticu, hepatosplenomegaliju, hiperpneju, tahikardiju, anginu pectoris ili zatajenje srca (Packman, 2015.).

Tablica 9. Podjela autoimunih hemolitičkih anemija prema komponentama

Komponente	**Tip AIHA**
Samo IgG	Topla AIHA
	AIHA potaknuta lijekom
Samo komplement	Topla AIHA s malim količinama IgG
	Bolest hladnih aglutinina
	Paroksizmalna hladna hemoglobinurija
	AIHA potaknuta lijekom
IgG i komplement	Topla AIHA
	Miješana (topla i hladna) AIHA
	AIHA potaknuta lijekom

Tablica 9. je prilagođena prema izvornoj tablici u preglednom radu Packman, 2015.

2.5.5. Laboratorijski pokazatelji tAIHA

Dijagnoza AIHA postavlja se na temelju laboratorijskih nalaza hemolize i dokaza autoimune komponente. Laboratorijski hematološki parametri hemolize su: hematokrit, laktat

dehidrogenaza (LDH), bilirubin, haptoglobin, retikulociti, te razmaz periferne krvi. Hematokrit može biti snižen na manje od 10%, ali u kompenziranim anemijama može biti i blizu normale. Povišene su vrijednosti nekonjugiranog bilirubina i LDH, a snižene vrijednosti serumskog haptoglobina. Sniženi hemoglobin, povišeni bilirubin i LDH diferencijalno se dijagnostički nalaze u nizu drugih bolesti npr. bolesti jetre, bolesti pluća, srčane bolesti, kod solidnih i hematoloških tumora, deficita vitamina B_{12} ili folne kiseline (Barcellini i sur., 2014., Barcellini i sur., 2018.). Normalne vrijednosti hemoglobina i LDH ne isključuju prisutnost hemolize (Zeerleder, 2011.). Zbog toga navedeni laboratorijski parametri nisu visoko specifični za postavljanje dijagnoze AIHA. Apsolutni broj retikulocita je sigurniji parametar koji pokazuje aktivaciju koštane srži kao odgovor na pojačane zahtjeve za stvaranjem novih eritrocita. Povišene vrijednosti retikulocita osim u hemolitičkoj anemiji opažaju se i kod akutnog gubitka krvi, a i kao odgovor na liječenje folnom kiselinom, željezom i vitaminom B_{12}. U anemiji kroničnih bolesti broj retikulocita je obično normalan ili tek blago povišen, dok je u autoimunoj hemolitičkoj anemiji apsolutni broj retikulocita najčešće izrazito povišen. Ipak jedna trećina bolesnika na početku može imati prolaznu retikulocitopeniju, koja se vidi u bolesnika s oštećenom funkcijom koštane srži, te onih s infekcijom parvovirusom, izloženih toksičnim kemikalijama, u bolesnika s malapsorpcijom, u bolesnika s autoprotutijelima usmjerenim na retikulocite (Conley i sur., 1980., Liesveld i sur., 1987., Dacie, 1992.).

U razmazu periferne krvi također se mogu pratiti promjene vezane za pojedine tipove AIHA. Polikromazija je odraz retikulocitoze, često se vidi sferocitoza, a mogu se vidjeti fragmenti eritrocita kao posljedica eritrofagocitoze, monocitoza te blaga leukocitoza i neutrofilija. U dijela bolesnika s AIHA prisutna je i autoimuna trombocitopenija (Evans i Duane, 1949.).

Autoimuna komponenta se dokazuje imunohematološkim ispitivanjem Coombsovim (antiglobulinskim) testom (direktnim i indirektnim). Ukoliko je direktni antiglobulinski test (DAT) pozitivan s polispecifičnim antihumanim gamaglobulinom, ispitivanje se nastavlja s monospecifičnim antihumanim gamaglobulinima. Time dokazujemo prisutnost pojedinih razreda antieritrocitnih autoprotutijela (IgG, IgA, IgM) i/ili komponenti komplementa (C3d, C3c). Osim razreda dokazuju se i podrazredi autoprotutijela i to IgG1 i IgG3. Osim vrste vezanih protutijela određuje se i količina (titar) ukupnih autoprotutijela razreda IgG te podrazreda IgG1 i IgG3. Time se na temelju količine za eritrocite vezanih auto protutijela procjenjuje stupanj rizika za ubrzanu razgradnju eritrocita (Zantek i sur., 2012.).

2.5.6. Liječenje tAIHA

S obzirom da je glavni simptom AIHA anemija, ovisno o stupnju njene izraženosti, bolesnika je potrebno liječiti suportivnom terapijom, kako bi se spriječio razvoj hipoksije i oštećenja organa. U tu svrhu primjenjuje se transfuzijsko liječenje koncentratima eritrocita. U teškim anemijama osobito je važno ne odgađati transfuzijsko liječenje, a to je vrlo često velik izazov za transfuziologe obzirom na tijek i opseg prijetransfuzijskog ispitivanja u bolesnika s AIHA. Izuzetno je važno otkriti sva aloprotutijela koja mogu biti prekrivena autoprotutijelima, a uzrokuju poslijetransfuzijsku hemolitičku reakciju. To su najčešće protutijela iz Rh, Kell, Kidd, Duffy i MNSs sustava krvnih grupa. Radi postizanja odgovarajuće sigurnosti u transfuzijskom liječenju eritrocite bolesnika s AIHA treba tipirati na slijedeće antigene: D, C, E, c, e, K, Jka, Jkb, Fya, Fyb, S i s. To je ponekad teško izvedivo zbog prisutnih autoprotutijela na vlastitim eritrocitima pa se određivanje bolesnikovih antigena mora raditi s monoklonskim reagensima u direktnoj aglutinacijskoj metodi, a u slučaju da je bolesnik nedavno transfundiran, postoji mogućnost genotipizacije krvnih grupa. Za transfuziju se odabiru eritrocitni pripravci koji su ABO, Rh (CcDEe) i K identični te antigen negativni koncentrati eritrocita za sve antigene na koja je bolesnik stvorio klinički značajna aloprotutijela. Kod izrazito velike količine bolesnikovih autoprotutijela, radi se adsorpcija s eritrocitima prethodno obrađenima ZZAP reagensom (kombinacija proteolitičkih enzima i sulfhidrilnog reagensa) radi otkrivanja aloprotutijela (Branch iPetz, 1982.). Idealno je raditi s bolesnikovim eritrocitima, ali kada to nije moguće, koriste se davateljevi eritrociti koji su antigen podudarni s bolesnikovim eritrocitima (Petz, 2004.). Križne probe se rade s neobrađenim i ZZAP adsorbiranim serumom, te se za transfuziju odabiru koncentrati eritrocita s dobivenom negativnom reakcijom, a samo u vitalnoj indikaciji pripravci s najslabije dobivenom pozitivnom reakcijom.

Ukoliko se radi o nepodudarnosti krvnih pripravaka uzrokovanoj samo autoprotutijelima, ne očekuje se akutna poslijetransfuzijska reakcija. Bolesnici koji u anamnezi nemaju transfuziju ili trudnoću vjerojatno neće imati klinički značajna aloprotutijela. Autoprotutijela razgrađuju vlastite eritrocite određenom brzinom i na taj način razgradit će i transfundirane eritrocite, no dio transfundiranih eritrocita ipak će ostati i odraditi svoju funkciju. Fagocitoza putem Fc i C3b je prirodno ograničen proces, tj. kapacitet makrofaga je ograničen i može se dalje smanjivati zbog kontinuirane hemolize i transfuzija eritrocita; kao da dolazi do iscrpljivanja makrofaga. Upravo to može pomoći u kompenziranju hemolize i opskrbi kisikom i tako pomoći u postizanju željenog učinka medikamentoznog liječenja. Transfuzijsko liječenje u teško

anemičnih bolesnika je brza i učinkovita mjera. Prije transfuzijskog liječenja potrebno je dati premedikaciju prednizolonom u istoj dozi kao i kod inicijalnog liječenja AIHA.

Obzirom na varijabilnu kliničku sliku AIHA, ciljano liječenje se odvija u nekoliko linija i razlikuje se ovisno o tipu AIHA (Barcellini i sur., 2014.).

Primarna topla AIHA počinje liječenje glukokortikoidima. Oko 80% bolesnika postigne djelomičnu ili kompletnu hematološku remisiju i tada nastavljaju liječenje dozama održavanja. Manji broj bolesnika kod kojih se učinak ne postigne unutar 3 tjedna kreću s drugom linijom liječenja, koja uključuje splenektomiju, a u slučaju refrakternosti i monoklonska protutijela rituximab (Barcellini i sur., 2012.). U slezeni se odvija i sinteza autoprotutijela i razgradnja eritrocita obloženih IgG autoprotutijelima. Zato splenektomija kao druga linija liječenja u tAIHA postiže uspjeh, no u dijela bolesnika s tAIHA ne rješava problem, vjerojatno zbog drugih mjesta sinteze autoprotutijela i zamjenske uloge jetre u razgradnji eritrocita.

Anti-CD20 monoklonska protutijela usmjerena su na stanice koje na površini pokazuju CD20, a to su limfociti B, koji bivaju uništeni putem aktivacije komplementa. Bolesnici koji počinju uzimati rituximab još uvijek nastavljaju s prednizonom sve do prvih znakova odgovora na rituximab. Najduža izmjerena remisija na rituximab bila je 2884 dana. Djelomična ili potpuna remisija na rituximab postiže se u oko 82% bolesnika.

Ukoliko nakon provedene druge linije liječenja odgovor i dalje nije zadovoljavajuć, može se nastaviti liječenje s imunosupresivima: azatioprin, mikofenolat mofetil (MMF), ciklosporin i ciklofosfamid. Kao posljednja linija liječenja može se pokušati druga vrsta monoklonskih protutijela (alemtuzumab).

Liječenje sekundarnih toplih AIHA djelomično se razlikuje i ovisi o osnovnoj bolesti, no radi se uglavnom o kombinacijama već navedenih lijekova. Postoji velik broj molekula razvijenih s ciljem regulacije pretjeranog imunološkog odgovora, a to su ofatumumab, alemtuzumab, bortezumib, anti-FcRn, TNT003 (inhibitor serinske proteaze C1s, peptidi inhibitori aktivacije C3, IgG-specifične endoglikozidaze (EndoS), inhibitori kinaza, bispecifična protutijela ili multivalentna protutijela (Lechner i Jäger., 2010.).

3. ISPITANICI I METODE

3.1. ISPITANICI

3.1.1. Etička odobrenja

Ovaj rad odobren je od strane Etičkog povjerenstva Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM) pod brojem odobrenja: klasa 003/06-15-04/05, ur.broj: 251-541-06/6-15-2, u Zagrebu 25.03.2015., te od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu po brojem odobrenja klasa: 641-01/15-02/01, ur.broj: 380-59-10106-15-168/88 u Zagrebu 23.04.2015.

3.1.2. Bolesnici i trudnice s antieritrocitnim autoptotutijelima razreda IgG

U istraživanje je bilo uključeno 100 bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG, prikupljeni u HZTM. Uz prethodni informirani pristanak, te njihovu pisanu suglasnost da pristaju na uzimanje uzorka za znanstveno istraživanje, uz potpuno objašnjenje razloga istraživanja, za što se uzorci koriste, uz dozvolu za pohranu uzoraka za dodatnu obradu nakon završetka početnog istraživanja te korištenje medicinske dokumentacije uz potpunu zaštitu osobnih osjetljivih podataka i šifriranost uzoraka u obradi, uzet je uzorak periferne krvi od 3 ml u epruvetu (BD Vacutainer, UK) s K_2EDTA antikoagulansom (engl. *Ethylenediaminetetraacetic acid, etilen-diamino-tetra-octena kiselina*) (1 epruveta) za određivanje broja retikulocita i izolaciju DNA za molekularnu dijagnostiku.

S obzirom na nisku incidenciju pojavnosti pozitivnog direktnog antiglobulinskog testa u općoj populaciji zbog autoprotutijela razreda IgG, prikupljanje dovoljnog broja pojedinaca i njihovih uzoraka trajalo je oko 3 godine. Uzorci su uzimani osobama upućenim u HZTM iz suradnih ustanova (Klinička bolnica Merkur, Klinička bolnica Sveti Duh, Klinička bolnica Dubrava, Opća bolnica Karlovac, Opća bolnica Koprivnica, Klinika za infektivne bolesti "Fran Mihaljević", Opća bolnica Zabok, Klinički bolnički centar Split) ili od liječnika primarne zdravstvene zaštite.

U prikupljenim uzorcima su unutar 24 sata od uzimanja određeni retikulociti te izolirana DNA. Kivete s uzorcima izolirane DNA koji nisu odmah obrađivani bili su zamrznuti na -20°C do korištenja. Za HLA-A, HLA-B, HLA-C rađena je samo niska rezolucija, a za HLA-DR i HLA-DQ učinjena je i dodatna provjera za visoku rezoluciju (HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-

DQB1). Niska rezolucija podrazumijeva molekularnu tipizaciju molekula HLA na razini alelne skupine odnosno 2 znamenke (npr. HLA-DQB1*03), a visoka rezolucija na razini alela odnosno 4 znamenke (npr. HLA-DQB1*03:03).

Skupinu od 100 ispitanika s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG (AA) činilo je 8 trudnica te 54 bolesnice i 38 bolesnika. Navedena skupina dodatno je podijeljena u 2 skupine. Prvu skupinu (N=42) činili su bolesnici i bolesnice s kliničkom sumnjom na autoimunu hemolitičku anemiju (AIHA) uzrokovanu autoprotutijelima razreda IgG, uz biokemijske laboratorijske pokazatelje hemolize. Drugu skupinu (N=58) činili su bolesnici i trudnice s autoprotutijelima razreda IgG, ali bez znakova hemolize (AP).

3.1.3. Kontrolna skupina

Kontrolnu skupinu za navedeno istraživanje sačinjavala je skupina od 190 dobrovoljnih darivatelja krvi s negativnim DAT-om i provedenim ispitivanjem polimorfizama sustava HLA razreda I i II, uz dodatnu provjeru visoke rezolucije sustava HLA razreda II (Dražić i sur., 2000., Dražić i sur., 2001.). Prema kriterijima za davanje krvi, darivatelji krvi mogu biti osobe od 18 do 65 godina, a uz odobrenje liječnika pri pregledu prije darivanja krvi, ako su dobrog zdravlja, mogu biti i stariji od 65 godina. Uz prethodni informirani pristanak, dobrovoljni darivatelji krvi su potpisali suglasnost da pristaju na uzimanje uzorka za znanstveno istraživanje, uz potpuno objašnjenje razloga istraživanja, za što se uzorci koriste, uz dozvolu za pohranu uzoraka za dodatnu obradu nakon završetka početnog istraživanja te uz potpunu zaštitu osobnih osjetljivih podataka i šifriranost uzoraka u obradi. Uzorci kontrolne skupine obrađivani su do 2003. pa je zbog otkrića novih alela DRB1*14:54 i DQA1*05:05, iz arhivskih uzoraka, učinjena dodatna provjera lokusa DRB1 i DQA1 za visoku rezoluciju (HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1) (Olerup SSP, Švedska). U skladu s novom nomenklaturom dio alela koji su prije određeni kao DRB1*14:01, postali su DRB1*14:54, a dio alela koji su prije određeni kao DQA1*05:01, postali su DQA1*05:05 (Pera i sur., 2000., Marsh i sur., 2010.). Uzorci izolirane DNA dobrovoljnih darivatelja krvi pohranjeni su u arhivi u ledenici pri -20°C.

3.2. POPIS I SASTAV UPORABLJENIH KEMIKALIJA

Epruveta s antikoagulansom K2EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) 5,4 mg od 3 mL (Becton Dickinson Vacutainer, Oxford, UK)
Mikrokartice polispecifične LISS/Coombs ID-Card Bio-Rad (Bio-Rad, Cressier, Švicarska)
Mikrokartice DC Screening ID-Card (Bio-Rad, Cressier, Švicarska)
Mikrokartice DC IgG1/IgG3 ID-Card Bio-Rad (Bio-Rad, Cressier, Švicarska)
Diluent 2 - modificirana otopina niske ionske jakosti (Bio-Rad, Cressier, Švicarska)
0,9%-tna otopina NaCl (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska)
Komercijalni testni eritrociti (Bio-Rad, Cressier, Švicarska)
Reagens na bazi boje New Methylen Blue, CELL-DYN Reticulocyte Reagent Kit (Abbott Laboratories, Illinois, USA)
QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka)
Liofilizirana proteinaza (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka)
Proteinaza otapalo (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka)
Lizirajući pufer (AL) (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka)
Pufer za eluciju (AE pufer) (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka)
Puferi za ispiranje (AW1 i AW2) (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka)
96-100% etanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
Bidestilirana voda, Aqua pro injectione (HZTM, Zagreb, Hrvatska)
HLA-SSP kompleti za nisku rezoluciju (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ) i za visoku rezoluciju (HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1) (Olerup SSP, Švedska)
Taq DNA polimeraza (Olerup SSP, Švedska)
Master Mix sadržan u HLA-SSP kompletima (Olerup SSP, Švedska)
Molekularni biljeg za PCR produkte od 100 pb (1µg/mL) (Invitrogen, Vilnius, Litva)
Etidij bromid (Sigma, Beč, Austrija)
1,5% agarozni gel s etidijevim bromidom - 3304 EB, PCR CheckIT Wide Mini 4X25 with EtBr (Al-Labortechnik, Zeillern, Austrija)

3.3. PRIBOR I APARATURA

Centrifuga Labofuge 400 (Heraeus, Švicarska)

ID-DiaMed Centrifuge (Bio-Rad, Cressier, Švicarska)

Mikropipete od 10μL, 50μL, 100μL, 1000 μL (Eppendorf, Njemačka)

Plastični nastavci za mikropipete bez filtera od 100μL i 1000 μL ((Eppendorf, Njemačka)

Plastični nastavci za mikropipete s filterom od 10μL ((Eppendorf, Njemačka)

Pločice za HLA tipizaciju

Staklene epruvete 100x15 mm (Sarstedt, Njemačka)

Plastične epruvete 75x12mm (Aptaca, Italija)

Plastične kivete za zamrzavanje (Aptaca, Italija)

Vodena kupelj (INKOLAB, Zagreb, Hrvatska)

Multiparametrijski hematološki analizator Cell-Dyn-Ruby (Abbott, USA)

Sterilni kabinet s laminarnim protokom zraka Iskra PIO LVFP (Slovenija))

Uređaj za izolaciju genomske DNA QiaCube (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka)

Miješalica za protresanje (Fischer Scientific, Švicarska)

Termoblok uređaj GeneAmp PCR System 9700 (Biosystems, USA)

Termoblok uređaj Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Biosystems, USA)

Sustav za elektroforezu SEA 2000 s UV iluminatorom (Elchrom, Švicarska)

Kamera DC 120 Zoom Digital Camera- KODAK (Kodak, USA)

Računalo

Računalna aplikacija Kodak Digital Science 1D2.0 (KDS1D)

Tablice za interpretaciju razlučivanja HLA alela (priložene uz svaki komercijalni HLA-SSP set)

Računalna aplikacija HELMBERG SCORE Software (W.M.C. Helmberg, Austrija)

Računalna aplikacija Windows 10 i Office

Računalna aplikacija MedCalc - verzija 16.2.1

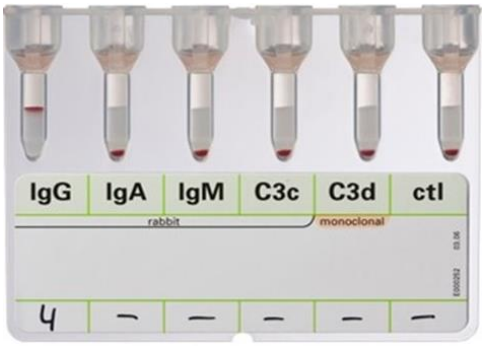
3.4. METODE

3.4.1. Direktni antiglobulinski test (DAT)

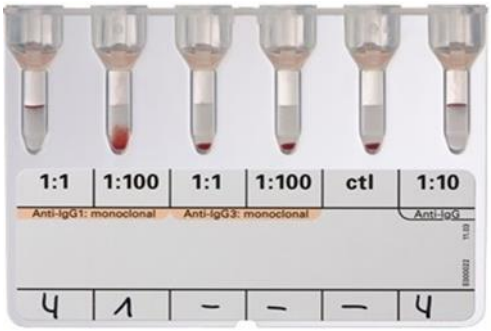
U imunohematološkom serološkom ispitivanju rađen je direktni antiglobulinski (Coombsov, DAT) test u gel mikrometodi u polispecifičnim LISS/Coombs ID-Card Bio-Rad mikrokarticama i pretraživanje imunoglobulinskih razreda u DC Screening ID-Card Bio-Rad. Samo IgG pozitivnim uzorcima rađeno je određivanje imunoglobulinskih podrazreda IgG1 i IgG3 u DAT IgG1/IgG3 ID-Card Bio-Rad. Mikrokartice su centrifugirane u uređaju ID-DiaMed Centrifuge.

Za imunohematološko ispitivanje je, nakon centrifugiranja uzorka ispitanika, iz koncentriranih eritrocita rađena 0,8% suspenzija eritrocita. U plastičnu epruvetu pipetirano je 1000 µL Diluenta 2 (otopine niske ionske jakosti) i dodano 10 µL koncentriranih eritrocita bolesnika iz centrifugiranog uzorka, sadržaj je resuspendiran. U jednu jažicu LISS/Coombs ID-Card mikrokartice u kojoj se nalazi polispecifičan antihumani gamaglobulin (poly AHG) dodano je 50µL 0,8% suspenzije eritrocita. Mikrokartica je centrifugirana u ID-DiaMed Centrifugi 10 minuta. Očitana je reakcija. Aglutinacija je pozitivan rezultat testa i ukazuje na reakciju između autoprotutijela vezanih na eritrocite i poly AHG-a, a nedostatak aglutinacije je negativan rezultat testa i znači da se na eritrocitima ne nalaze vezana autoprotutijela i/ili komponente komplementa. Nakon očitanja pozitivne reakcije određeni su imunoglobulinski razredi autoprotutijela dodavanjem 50 µL 0,8% suspenzije eritrocita u svaku jažicu DC Screening ID-Card mikrokartice, koja je sadržavala monospecifičan AHG. ID-kartica DC-Screening I sadrži pet različitih monospecifičnih AHG reagensa: anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-C3c (svi zečji) i anti-C3d (monoklonalni, stanična linija C139-9), uklopljenih u gel, te negativnu kontrolu (Slika 10.). Kod utvrđene aglutinacije u jažici s anti-IgG AHG-om, određivani su podrazredi IgG1 i IgG3 autoprotutijela i njihov titar dodavanjem 50 µL 0,8% suspenzije eritrocita u svaku jažicu DAT IgG1/IgG3 ID-Card mikrokartice (Slika 11.). IgG1 i IgG3 podrazredi su klinički najznačajniji podrazredi ljudskih autoprotutijela. ID-kartica DAT IgG1/IgG3 ima 6 mikrostupaca koji sadrže monoklonalni anti-IgG1 (stanična linija M345/795) u dva različita razrjeđenja, anti-IgG3 (stanična linija M346/805) također u dva različita razrjeđenja, anti-IgG 1:10 (zečjeg porijekla) unutar gel-mrežice te negativnu kontrolu. Pozitivna reakcija s prvim razrjeđenjem odgovara obloženosti eritrocita od 1000 IgG1 molekula odnosno 125 IgG3

molekula po stanici. Pozitivna reakcija s drugim razrjeđenjem ukazuje na visoku koncentraciju IgG1 i/ili IgG3 protutijela.



Slika 10. Određivanje razreda autoprotutijela i prisutnosti komponenti komplementa s monospecifičnim antihumanim gamaglobulinom (anti-IgG, -IgA, -IgM, -C3c -C3d).



Slika 11. Određivanje podrazreda IgG1 i IgG3 i titra autoprotutijela s monoklonskim antihumanim gamaglobulinima (anti-IgG1, -IgG3).

3.4.2. Test elucije

Testom elucije uklonjena su autoprotutijela s površine eritrocita, a njihova specifičnost za antigene eritrocitne membrane je dokazana u indirektnom antiglobulinskom testu (IAT) s panelom fenotipiranih testnih eritrocita. Test je rađen metodom toplinske elucije pri 56 ˚C prema knjizi *Judd's methods in immunohaematology* (Judd i sur., 2008.). Za eluciju je korištena topla vodena kupelj.

3.4.2.1. Postupak eluiranja autoprotutijela

Iz prethodno centrifugirane epruvete s uzorkom krvi bolesnika odvojeno je 2 mL koncentriranih eritrocita u suhu staklenu epruvetu (100x15 mm). Na eritrocite je dodano, do vrha epruvete, 0,9%-tne otopine NaCl i epruveta je centrifugirana pri 3000 okretaja/min tijekom 2 minute. Nakon centrifugiranja plastičnom pipetom u potpunosti je uklonjen supernatant. Postupak je

ponovljen ukupno 6 puta. Nakon šestog pranja supernatant je prenesen u novu plastičnu epruvetu. Na sediment 6 puta opranih eritrocita dodan je jednaki volumen 0,9%-tne otopine NaCl, te su eritrociti resuspendirani pipetom. Suspenzija eritrocita inkubirana je u vodenoj kupelji pri 56°C tijekom 10 minuta, uz često lagano miješanje suspenzije protresanjem zatvorene epruvete. Nakon završene inkubacije, epruveta je centrifugirana pri 3000 okretaja/min tijekom 3 minute. Dobiveni supernatant tj. eluat je odmah plastičnom pipetom odvojen u posebnu plastičnu epruvetu i ispitan mikrometodom u IAT-u s komercijalnim testnim eritrocitima. Supernatantna otopina nakon 6. pranja ispitana je u IAT-u s istim testnim eritrocitima i služila je kao negativna kontrola. Ako je supernatantna fiziološka otopina sadržavala protutijela dokazana u eluatu, zaključilo se da je pranje eritrocita bilo nedostatno i rezultat testa je ponovljen.

3.4.3. Određivanje broja retikulocita

Za određivanje broja retikulocita, korišteni su pretežno svježi uzorci, a iznimno čuvani pri +4°C do 24 sata od vađenja krvi. Metoda dozvoljava rad s uzorcima čuvanim pri +4°C do 72 sata od vađenja krvi. Broj retikulocita određivan je na multiparametrijskom hematološkom analizatoru CELL-DYN Ruby u HZTM. Uređaj koristi reagens na bazi boje New Methylen Blue, CELL-DYN Reticulocyte Reagent Kit, koja boji RNA retikulocita. CELL-DYN Ruby koristi tehniku protočne citometrije. Uzorak protječe u tankom sloju i bude obasjan laserskim snopom. Senzor (ili senzori) mjeri, gubitkom refleksije svjetla, fizikalne ili kemijske karakteristike stanica ili čestica. Mjerenje se radi na 0°, 10° i 90° za eritrocite i na 0° i 10° za trombocite. Hemoglobin se mjeri fotometrijski pri valnoj duljini 555 nm. Leukociti se određuju emisijom svjetla pod djelovanjem lasera. Emisija svjetla mjeri se na 4 detektora locirana na prednjim (0°i 10°) i bočnim (90° i 90°D) kutovima. Broj retikulocita izražen je kao postotak. Za odrasle je raspon od 95% normalne raspodjele između 0,88 - 2,37% za ovu metodu. Temeljem broja eritrocita i vrijednosti hematokrita izračunat je apsolutni broj retikulocita i izražen kao broj x 10^9/L.

3.4.4. Izolacija genomske DNA iz leukocita periferne krvi

Iz uzorka pune krvi izdvojen je sloj leukocita, iz kojeg se izolirala genomska DNA. Izolacija genomske DNA rađena je na silikatnim membranama komercijalnim kitom QIAamp DNA Blood Mini Kit na uređaju QiaCube prema uputama proizvođača.

Izolacija DNA iz biološkog materijala pomoću silika-gel membrane temeljena je 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. Svi ostali stanični dijelovi koji po sastavu nisu nukleinske kiseline, kao što su polisaharidi i proteini se ne adsorbiraju te se uklanjaju ispiranjem. Nakon ispiranja, pročišćena nukleinska kiselina visokog prinosa se eluira s kolone u malom volumenu pufera ili bidestilirane vode.
Prema uputi proizvođača priređeni su reagensi za rad. Za radnu otopinu proteinaze je u bočicu s liofiliziranom proteinazom dodano otapalo za proteinazu. Otopljeni sadržaj je promiješan, alikvotiran i pohranjen pri -20°C do upotrebe. Dodavanjem apsolutnog etanola u pufer AW1 i AW2 priređeni su puferi AW1 i AW2.

3.4.4.1. Postupak izolacije DNA

U epruvetu od 1,5 mL dodano je 20 μL proteinaze i 200 μL leukocitno-trombocitnog međusloja (engl. *buffy coat*). Za uzorke manje od 200 μL, 0,9%-tna otopina NaCl je služila za nadopunu do volumena od 200 μL. Zatim je u epruvetu dodano 200 μL lizirajućeg pufera (AL), te je epruveta protresena pomoću miješalice 15 sekundi. Uzorak je zatim inkubiran 10 minuta pri 56°C.
Na uzorak je dodano 200 μL apsolutnog etanola (96-100%) i zatim je epruveta snažno protresena pomoću miješalice 15 sekundi.
Ta mješavina je dodana na kolonu sa silika-gel membranom postavljenu u epruvetu od 2 mL, te je epruveta centrifugirana 1 minutu pri 11 500 okretaja u minuti.
Kolona sa silika-gel membranom je prenesena u novu epruvetu od 2 mL, a epruveta s filtratom bačena. Dodano je 500 μL pufera za ispiranje kolone (pufer AW1), te je epruveta centrifugirana 1 minutu pri 11 500 okretaja/min.
Epruveta s eluatom je zatim bačena, a kolona sa silika-gel membranom prenesena u novu epruvetu. Dodano je 500 μL pufera za ispiranje na kolonu (AW2) i centrifugirano 3 minute pri 14 000 okretaja u minuti.
Eluat je bačen, a kolona sa silika-gel membranom postavljena na istu praznu epruvetu i ponovnim centrifugiranjem kroz jednu minutu na maksimalnom broju okretaja odstranjeni su ostatci pufera za ispiranje kolone.

Epruveta s eluatom je odbačena, a kolona sa silika-gel membranom je postavljena u novu epruvetu od 1,5 mL. Direktno na kolonu je pažljivo dodano 300 μL pufera za eluciju (AE pufer) ili bidestilirane vode.
Nakon inkubacije tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi, epruveta je centrifugirana 1 minutu pri 11 500 okretaja/min.

3.4.4.2. Ispitivanje kvalitete DNA

Prinos i kvaliteta DNA provedena je elektroforezom na 0,5%-tnom agaroznom gelu. Elektroforetskim razdvajanjem jasno je prikazano da li je izolirana DNA intaktna, odnosno da li je došlo do cijepanja DNA molekula i degradacije. Nakon završetka elektroforeze, gel je snimljen. DNA nije kvantificirana spektrofotometrijski jer je za izolaciju DNA korišten standardiziran komplet QIAamp DNA Blood Mini Kit na uređaju QiaCube (QIAGEN, Njemačka) prema uputama proizvođača. Proizvođač garantira intaktnu DNA duljine od 200 pb do 50 kb. Dobivena genomska DNA visoke čistoće i zadovoljavajućeg prinosa koristila se za ispitivanje metodom lančane reakcije polimerazom (PCR, *engl. Polymerase Chain Reaction*).

3.4.5. PCR-SSP metoda za HLA tipizaciju

Lančana reakcija polimerazom je *in vitro* reakcija umnožavanja ciljnog dijela DNA pomoću enzima Taq polimeraze, koristeći specifične oligonukleotidne početnice (*engl. primere*), koji prepoznaju i komplementarno se vežu na dijelove DNA kalupa. Preduvjet za izvođenje reakcije je poznavanje slijeda nukleotida rubnih dijelova odsječka DNA koji se želi umnožiti, na temelju kojeg se konstruiraju oligonukleotidne početnice, te postojanje barem jedne početne molekule DNA koja u reakciji ima ulogu kalupa tj. predloška za lanac u nastanku. PCR-SSP metoda s početnicama specifičnim za sekvencu (SSP, *engl. Sequence Specific Primer*) je podvrsta PCR, a metoda se zasniva na nemogućnosti Taq polimeraze da popravi neslaganje u jednoj bazi na 3' kraju DNA početnice.
Dakle, kada je nukleotid na 3' kraju početnice komplementaran sekvenci na kraju alela, doći će do umnožavanja (amplifikacije) sekvence. Kada 3' nukleotid početnice nije komplementaran kalupu, neće doći do umnožavanja sekvence ili će se umnožiti u vrlo maloj količini. U svakoj SSP reakciji istodobno se radi amplifikacija ulomka gena hormona rasta koji služi kao interna pozitivna kontrola da bi se potvrdila prisutnost DNA u reakcijskoj smjesi. Za HLA tipizaciju korišteni su komercijalni HLA-SSP kitovi za nisku rezoluciju pojedinih HLA lokusa i grupa

alela (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQ), a za alele lokusa HLA-DR i HLA-DQ učinjena je i dodatna provjera za visoku rezoluciju (HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1). Položaj nukleotida za gene HLA razreda I i kodona za gene HLA razreda II, u 2. ili 3. egzonu, odgovaraju specifičnosti na 3' kraju danih početnica. S obzirom da se radi o standardiziranim molekularnim kompletima te podatci o početnicama nisu dostupni, u slijedećim tablicama navedene su ciljne regije za amplifikaciju alela u HLA-SSP kompletima: u Tablici 10. za lokuse HLA-A, HLA-B, HLA-C i HLA-DR, u Tablici 11. za lokus DQB1 na razini niske rezolucije tj. prepoznavanja odgovarajuće serološke specifičnosti, u Tablici 12. za lokus DQB1 koji omogućuju serološku razdiobu DQ3 na DQ3, DQ7, DQ8, DQ9, u Tablici 13. za lokus DQB1 na razini visoke rezolucije i u Tablici 14.za lokus DQA1.

Tablica 10. Ciljne regije za amplifikaciju alela u HLA-SSP kompletima

HLA-SSP komplet	**Ciljne regije alela**
HLA-A	*A*01:01* do *A*80:03*
HLA-B	*B*07:02* do *B*83:01*
HLA-C	*C*01:02* do *C*18:10*
HLA-DR	*DRB1*01:01* do *DRB1*10:17*
HLA-DRB1*04	**04:01* do **04:241*
HLA-DRB1*11	**11:01* do **11:217N*
HLA-DRB1*13	**13:01* do **13:226*
HLA-DRB1*14	**14:01* do **14:199*
HLA-DRB1*07	**07:01* do **07:70*
HLA-DRB1*09	**09:01* do **09:32*
HLA-DRB1*15	**15:01* do **15:139*
HLA-DRB1*16	**16:01* do **16:47*
HLA-DRB1*08	**08:01* do **08:82*
HLA-DRB1*12	**12:01* do **12:67*
HLA-DRB1*10	**10:01* do **10:22*
HLA-DRB1*14	**14:01* i **14:54*

Tablica 11. Ciljne regije za amplifikaciju alela u HLA-SSP kompletima lokusa DQB1 niske rezolucije

Serološka specifičnost	**Ciljne regije alela**
DQ5	*DQB1*05:01* do *05:05*
DQ6	*DQB1*06:01* do *06:33*
DQ2	*DQB1*02:01* do *02:05*
DQ3	*DQB1*03:01* do *03:20*
DQ4	*DQB1*04:01* do *04:02*

Tablica 12. Ciljne regije za amplifikaciju alela u HLA-SSP kompletima lokusa DQB1 niske rezolucije -serološka razdioba DQ3

Serološka specifičnost	**Ciljne regije alela**
DQ3	*DQB1*03:06, 03:10, 03:14*
DQ7	Od *DQB1*03:01:01* do *03:01:03, 03:04, 03:09, 03:13, 03:16, 03:19*
DQ8	*DQB1*03:02:01, 03:05:01, 03:07, 03:08, 03:11, 03:18*
DQ9	*DQB1*03:03:02, 03:12, 03:15, 03:17, 03:20*

Tablica 13. Ciljne regije za amplifikaciju alela u HLA-SSP kompletima lokusa DQB1 visoke rezolucije

HLA-SSP komplet	**Ciljne regije alela**
DQB1*05	*DQB1*05:01* do *05:131*
DQB1*06	*DQB1*06:01* do *06:352*
DQB1*02	*DQB1*02:01* do *02:112*
DQB1*03	*DQB1*03:01* do *03:269N*
DQB1*04	*DQB1*04:01* do *04:42*

Tablica 14. Ciljne regije za amplifikaciju alela u HLA-SSP kompletima lokusa DQA1 visoke rezolucije

HLA-SSP komplet	Ciljne regije alela
DQA1*01	*DQA1*01:01* do *01:43*
DQA1*02	*DQA1*02:01* do *02:10*
DQA1*03	*DQA1*03:01* do *03:12*
DQA1*04	*DQA1*04:01* do *04:07*
DQA1*05	*DQA1*05:01* do *05:22*
DQA1*06	*DQA1*06:01* do *06:02*

3.4.5.1. Protokol za pripravljanje PCR-mješavine za PCR reakciju

Protokol je opisan u uputi proizvođača a broj reakcija ovisi o broju početnica. Postupak je proveden u kabinetu s laminarnim protokom zraka. U epruvetu od 2 mL je dodano reagensa potrebnog za određeni broj jažica, a mješavina za jednu jažicu pripravljena je prema uputi:

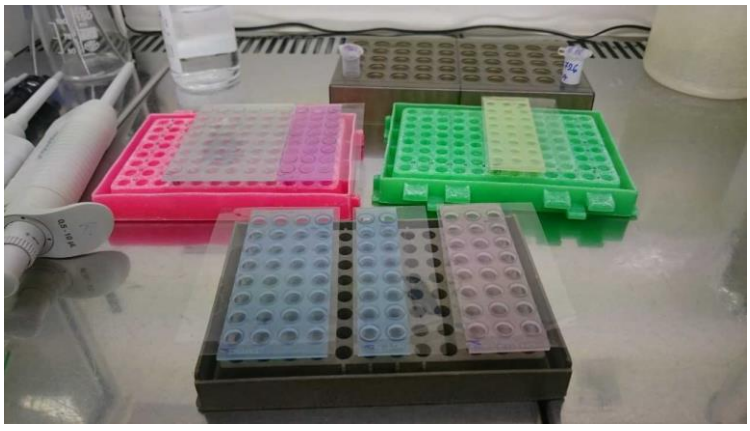
6 μL *Master-Mix-a* (sadržanog u SSP kompletima)

9,45 μL *Aqua pro injectione*

4 μL DNA (30-50 ng/μl)

0,15 μL Taq DNA polimeraze

U svaku jažicu PCR pločice dodano je 10 μL priređene PCR mješavine i pločica je dobro zatvorena samoljepljivim pokrovom (Slika 12.) kako bi se spriječilo isušivanje jažica tijekom PCR reakcije.



Slika 12. Pločice za HLA tipizaciju s ukapanim početnicama i PCR mješavinom prije stavljanja u termoblok uređaj za PCR reakciju (fotografija autora)



Slika 13. Termoblok uređaj



Slika 14. Termoblok uređaj

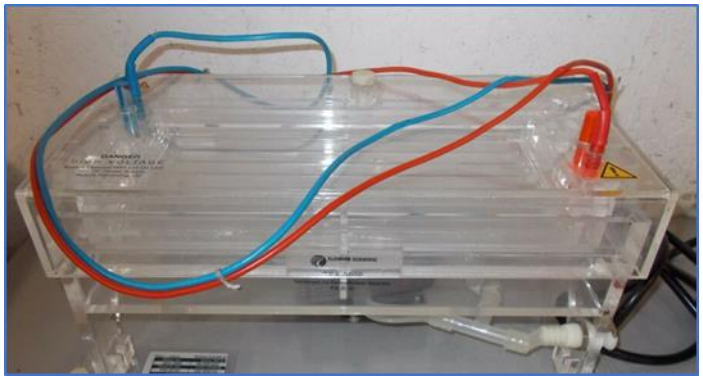
Lančana reakcija polimerazom učinjena je pomoću termoblok uređaja (Slika 13. i 14.) u kojima je odabran program za SSP-PCR s točno zadanim ciklusima (Tablica 15.).

Tablica 15. Parametri programa za SSP-PCR

Proces	**Temperatura**	**Trajanje**	**Broj ciklusa**
Denaturacija:	94°C	2 minute	1 ciklus
Denaturacija: Vezanje početnica i elongacija	94°C 65°C	10 sekundi 60 sekundi	10 ciklusa
Denaturacija: Vezanje početnica Elongacija:	94°C 61°C 72°C	10 sekundi 50 sekundi 30 sekundi	20 ciklusa
Hlađenje:	4°C	∞	

3.4.5.2. Elektroforeza umnoženih produkata PCR-SSP u gelu agaroze

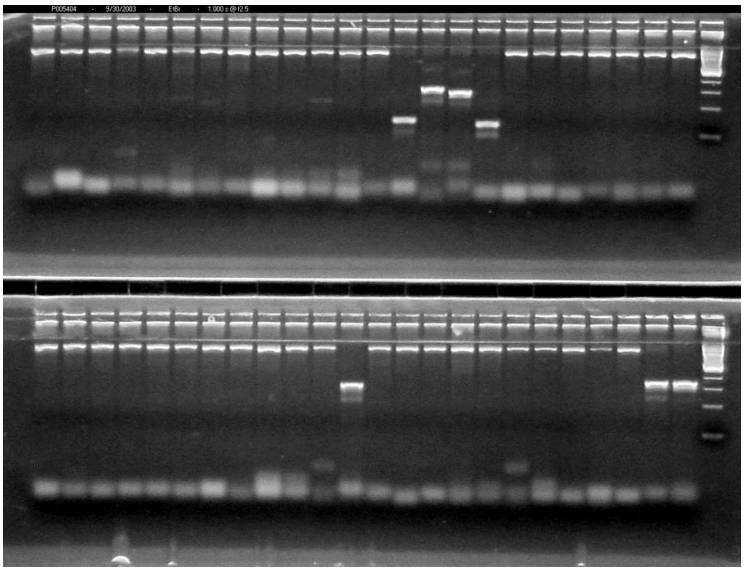
Elektroforeza je metoda razdvajanja molekula na temelju razlike u njihovom naboju, molekularnoj masi i obliku. PCR-om umnoženi dijelovi - ulomci DNA pod utjecajem istosmjerne električne struje različitom brzinom putuju kroz gel na temelju razlike u veličini molekule (Slika 15.). Detekcija produkata PCR amplifikacije rađena je pomoću elektroforeze na 1,5%-tnom agaroznom gelu s etidijevim-bromidom u gotovim PCR CheckIT Wide Mini gelovima. Cjelokupni sadržaj (10 μL) svake pojedine jažice otpipetiran je na gel. Gel načinjen od agaroze kao linearnog polimera sastavljenog od ponavljajućih monomernih jedinica agarobioze je neutralnog naboja i ima relativno velike pore što omogućava razdvajanje velikih molekula. Etidijev bromid prisutan u gelu, umrežava se u strukturu DNA pa PCR produkti odnosno ulomci postaju vidljivi kada se gel obasja UV svjetlošću. Nakon završene elektroforeze, gel je pregledan pod UV iluminatorom (valna duljina 312 nm), fotografiran kamerom DC 120 Zoom Digital Camera - KODAK, a slika obrađena odgovarajućim računalnim programom - Kodak Digital Science 1D 2.0 (KDS1D) (Slika 16.). Svaka pojedinačna traka u gelu odgovara točno određenoj sekvenci (alelu).



Slika 15. Elchrom Scientific sustav za elektroforezu

3.4.6. Očitavanje rezultata

Specifičnost svake pojedine amplifikacije provjerena je pomoću tablica za interpretaciju, koje su priložene uz svaki komercijalni HLA-SSP set i pomoću HELMBERG SCORE Software-a (W.M.C. Helmberg, Austrija).



Slika 16. Prikaz elektroforetskog razdvajanja umnoženih produkata PCR-SSP HLA razlučivanja alela (primjer: HLA-B) (vlasništvo HZTM)

3.5. Statistička obrada rezultata

Usporedba rezultata je učinjena pomoću aplikacije MedCalc - version 16.2.1. Za usporedbu dobi korišten je Mann-Whitney test, a za usporedbu spola, jačine DAT-a, IgG podrazreda i dijagnoza korišten je χ^2 test. Učestalost gena i alela dobivena je direktnim brojanjem. Učinjena je usporedba rezultata dobivenih za kontrolnu skupinu, skupine iz literaturnih podataka (Grubić i sur., 1995., Grubić i sur., 2000., Mack i sur., 2009., Grubić i sur., 2014.) i skupina AA, AIHA i AP. Haplotipske veze HLA u ispitanika kontrolne skupine uspoređene su s literaturnim podacima o neravnoteži udruživanja alela HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1 (Klitz i sur., 2003.) i u hrvatskoj populaciji (Grubić i sur., 2000.). Za usporedbu učestalosti alela i haplotipova skupine bolesnika i trudnica (AA) te skupina AIHA i AP s kontrolnom skupinom dobrovoljnih darivatelja krvi korišten je χ^2 test, a za usporedbu učestalosti pojedinih alela korišten je Fisherov egzaktni test. Ukoliko je razlika između skupina prema učestalosti pojedinog alela bila veća od 5% učinjena je post-hoc analiza. Kao granica razine statističke značajnosti postavljena je vrijednost $p<0,05$. Zbog izraženog polimorfizma gena sustava HLA, dobivena p vrijednost korigirana je po Bonferroniju brojem usporedbi na pojedinom lokusu prema formuli:

$$p_k=1-(1-p)^n$$

pri čemu je p_k - korigirana p vrijednost (Svejgaard i Ryder, 1994.). Na primjer, na lokusu HLA-DQB1 testirano je 17 alela pa je za usporedbu učestalosti alela skupine AA i kontrolne skupine učinjeno 17 usporedbi, N=17. Kada smo skupinu AA podijelili u 2 skupine i obje skupine uspoređivali s kontrolnom skupinom učinjeno je ukupno 2x17=34 usporedbe pa je n=34. Ako je korigirana p vrijednost (p_k) i dalje bila manja od 0,05 (p_k <0,05), smatralo se da postoji statistički značajna razlika u učestalosti pojedinog alela između skupine ispitanika AA, AIHA, AP i kontrolne skupine. Snaga testa izračunata je kao omjer izgleda (engl. *odds ratio*, OR) uz interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*, CI) od 95%.

4. REZULTATI

Ovim istraživanjem utvrđeni su polimorfizmi sustava gena i alela HLA u skupini od 100 bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG (AA). Učinjena je usporedba dobi i spola u odnosu na kontrolnu skupinu od 190 dobrovoljnih darivatelja krvi (Tablica 16.).

Tablica 16. Usporedba dobi i spola u skupini bolesnika (AA) s kontrolnom skupinom

	AA **N=100**	**Kontrolna skupina** **N=190**
Dob, medijan [95% CI]	64 [59 - 66]	41 [39 - 44]
(min-maks)	(19 - 94)	(19 - 62)
Dob po spolu, medijan [95% CI]		
(min-maks)		
Muškarci (M)	66 [61 - 72]	43 [40 - 45]
	(19 - 86)	(19-61)
Žene (Ž)	62 [51 - 66]	34 [31 - 39]
	(19 - 94)	(21 - 62)
M/Ž (omjer)	38/62 (1:1,63)	149/41(3,63:1)

AA - bolesnici i trudnice s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG, min - minimum, maks - maksimum

Medijan dobi u skupini AA bio je 64 godine u odnosu na 41 u kontrolnoj skupini. Kontrolnu skupinu sačinjavali su dobrovoljni darivatelji krvi, muškarci i žene, u dobi od 19 do 62 godine, dok je skupinu ispitanika s autoprotutijelima razreda IgG (AA) činilo 92 bolesnika (od 19 do 94 godine starosti) i 8 trudnica (od 26 do 39 godina starosti).

Omjer muškaraca i žena u kontrolnoj skupini bio je statistički značajno veći ($p<0,0001$) u odnosu na skupinu AA u kojoj je bilo više žena (Tablica 16.).

Skupina od 100 bolesnika i trudnica podijeljena je, na temelju prisutnih znakova hemolize, u 2 skupine: prvu skupinu od 42 bolesnika sa znakovima hemolize (AIHA) i drugu skupinu od 58 ispitanika (50 bolesnika i 8 trudnica), bez dokazane hemolize (AP). U ispitanika u AIHA skupini (Tablica 17.) vrijednosti retikulocita bile su povišene u 38 (90%) bolesnika, snižene u

2 (5%) bolesnika i unutar normalnih vrijednosti u 2 (5%) bolesnika, dok su u AP skupini bile unutar intervala normalnih vrijednosti (Tablica 18.).

Tablica 17. Biokemijski parametri u bolesnika s kliničkom sumnjom na AIHA (N=42)

Parametri		**Referentne vrijednosti (Flegar-Meštrić, 2000.)**
Hemoglobin g/L, medijan (raspon)	(Ž) 74 (45 - 114) (M) 72 (41 - 114)	(Ž) 118 - 149 (M) 138-175
Retikulociti x 10^9/L	159 (5,54 - 658)	22 - 97
LDH U/L, median (raspon)	375 (253 - 929)	< 320
Bilirubin μmol/L	36 (11,1 - 69)	3 - 20

M - muškarci, Ž - žene, LDH - enzim laktat dehidrogenaza podaci za vrijednosti LDH i bilirubina su iz bolničkog informatičkog sustava

Tablica 18. Vrijednosti hemoglobina i retikulocita u osoba bez hemolize (N=58)

Parametri		**Referentne vrijednosti (Flegar-Meštrić, 2000.)**
Hemoglobin g/L, medijan (raspon)	(Ž) 125 (46,6 - 166) (M) 124 (72,7 - 146)	(Ž) 118 - 149 (M) 138-175
Retikulociti x 10^9/L	52,6 (22,2 - 92,7)	22 - 97

M - muškarci, Ž - žene

Medijan za dob bio je najveći u skupini AIHA, zatim u skupini AP, a najmanji je u kontrolnoj skupini (Tablica 19.). U skupini AIHA i muškarci i žene bili su većinom starije životne dobi. Veća učestalost ženskog spola u odnosu na kontrolnu skupinu zabilježena je u obje promatrane skupine (AIHA i AP). Bolesnici sa znakovima autoimune hemolitičke anemije imali su pretežno više vrijednosti (score) DAT-a u odnosu na bolesnike i trudnice bez hemolize (AP skupina) (Tablica 20.). Što je DAT bio jače pozitivan to je relativni udio ispitanika skupine AIHA u odnosu na ispitanike skupine AP bio statistički značajno veći (p=0,0008).

Tablica 19. Usporedba dobi i spola u skupini AIHA i u skupini AP s kontrolnom skupinom

	AIHA N=42	AP N=58	Kontrolna skupina N=190	p
Dob, medijan [95% CI] (min-maks)	66 [62 - 73] (26 - 94)	58 [36 - 65] (19 - 86)	41 [39 - 44] (19 - 62)	
Dob po spolu, medijan [95% CI] (min-maks)				
Muškarci (M)	68 [62 - 74] (37 - 86)	66 [28 - 71] (19 - 85)	43 [40 - 45] (19-61)	
Žene (Ž)	64 [54 - 73] (26 - 94)	49 [35 - 65] (19 - 86)	34 [31 - 39] (21 - 62)	
M/Ž (omjer)	18/24 (1:1,33)	20/38 (1:1,9)	149/41(3,63:1)	< 0,0001

M - muškarci, Ž - žene, AIHA - bolesnici sa znakovima hemolize, AP - bolesnici i trudnice bez dokazane hemolize, min - minimum, maks - maksimum

Tablica 20. Usporedba jačine DAT-a u skupini AIHA (n=42) i u skupini AP (n=58)

DAT (score)	**AIHA** **n (%)**	**AP** **n (%)**
1+	2 (4,8)	10 (17,2)
2+	4 (9,5)	13 (22,4)
3+	16 (38,1)	24 (41,4)
4+	20 (47,6)	11 (19,0)

DAT - direktni antiglobulinski test, AIHA - bolesnici sa znakovima hemolize, AP - bolesnici i trudnice bez dokazane hemolize, χ^2 za trend= 11,34; p=0,0008

Nije uočena statistički značajna razlika između skupina AIHA i AP u odnosu na učestalost pojave antieritrocitnih autoprotutijela razreda IgG kada su se uz njih pojavile i komponente komplementa C u odnosu na pojavnost samih antieritrocitnih autoprotutijela razreda IgG bez komplementa (p=0,124) (Tablica 21.).

Statistički je značajno veća učestalost ukupnih antieritrocitnih autoprotutijela podrazreda IgG1 u skupini AIHA (p = 0,006). Autoprotutijela razreda IgG kojima nije dokazan podrazred bila su statistički značajno češća u skupini AP (p = 0,01).

Tablica 21. Usporedba IgG podrazreda autoprotutijela u skupini AIHA (N=42) i u skupini AP (N=58)

Podrazred IgG autoprotutijela	**AIHA N (%)**	**AP N (%)**	**p**
IgG	25 (59,5)	43 (74,1)	0,124
IgG + C	17 (40,5)	15 (25,9)	0,124
Samo IgG1	25 (59,5)	24 (41,4)	0,075
Samo IgG3	1 (2,4)	3 (5,2)	0,637
IgG1 + IgG3	10 (23,8)	9 (15,5)	0,299
Ni IgG1 ni IgG3	6 (14,3)	22 (37,9)	0,01
Ukupni IgG1	35 (83,3)	33 (56,9)	0,006

AIHA - bolesnici sa znakovima hemolize, AP - bolesnici i trudnice bez dokazane hemolize

Osim primarne autoimune hemolitičke bolesti (33%), najčešće dijagnoze u skupini AIHA su bile hematoonkološke (43%), pretežno limfoidne loze (Tablica 22.) i autoimune bolesti (14%). Prema spolu primarnu AIHA imalo je 3 (17%) muškaraca i 11 (46%) žena (p=0,057), hematoonkološke bolesti imalo je 11 (61%) muškaraca i 7 (29%) žena (p=0,04) i autoimune bolesti imalo je 2 (11%) muškaraca i 4 (17%) žena (p=0,685).

U skupini ispitanika s antieritrocitnim autoprotutijelima bez hemolize (AP) najčešće dijagnoze su bile hematoonkološke (19%), autoimune bolesti (16%), solidni tumori (16%) i infekcije (9%). Prema spolu hematoonkološke bolesti imalo je 6 (30%) muškaraca i 5 (13%) žena (p=0,119), autoimune bolesti 2 (10%) muškarca i 7 (18%) žena (p=0,476) i solidne tumore 3 (15%) muškarca i 6 (16%) žena (p=1,000).

Tablica 22. Usporedba dijagnoza u skupini AIHA (N=42) i skupini AP (N=58)

Dijagnoze	**AIHA** N (%)	**AP** N (%)
Hematoonkološke, ukupno	**18 (43)**	**11 (19)**
Limfoidne bolesti	15 (36)	6 (10)
MH+ITP	-	1 (2)
KLL+ITP+solidni tumor	1 (2)	-
Mijeloidne bolesti	2 (5)	4 (7)
Autoimune bolesti	6 (14)	9 (16)
Solidni tumori	1 (2)	9 (16)
Infekcije	1 (2)	5 (9)
Tumor+autoim.+infekcija	-	1
KOPB	1	-
Kronična bubrežna bolest	-	2
Srčane bolesti	-	2
Operacije, ukupno		
Fraktura kuka/koljena	-	3
Krvne žile	1	
Abdominalne, opće	-	3
Trudnice+autoimune bolesti	-	2
Trudnice	-	6
Ostalo	-	5
Primarna AIHA	14 (33)	-

AIHA - ispitanici s toplom autoimunom hemolitičkom anemijom, AP- ispitanici s antieritrocitinim autoprotutijelima razreda IgG bez hemolize, MH - morbus Hodgkin, ITP - imuna trombocitopenija, KLL - kronična limfoblastična leukemija, KOPB - kronična obstruktivna bolest pluća; hematoonkološke dijagnoze zastupljenije su u AIHA skupini (p=0,0095)

4.1. Aleli HLA razreda I - skupina AA *vs* kontrolna skupina

U Tablicama 23., 24. i 25. prikazani su rezultati analize pojedinih grupa alela HLA razreda I, u skupini bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG (AA) te u kontrolnoj skupini dobrovoljnih darivatelja krvi (kontrolna skupina).

U skupini bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG (AA) nađeno je 14 različitih alela lokusa HLA-A i 16 u kontrolnoj skupini (Tablica 23.).

Tablica 23. Učestalost alela lokusa HLA-A u skupini AA (N=200) u odnosu na učestalost istog alela kod ispitanika kontrolne skupine (N=380).

Aleli lokusa HLA-A	**Kontrolna skupina N (%)**	**AA N (%)**
*A*01*	39 (10,3)	29 (14,5)
*A*02*	113 (29,7)	72 (36,0)
*A*03*	63 (16,6)	28 (14,0)
*A*11*	31 (8,2)	12 (6,0)
*A*23*	7 (1,8)	5 (2,5)
*A*24*	43 (11,3)	18 (9,0)
*A*25*	15 (3,9)	5 (2,5)
*A*26*	16 (4,2)	9 (4,5)
*A*29*	3 (0,8)	1 (0,5)
*A*30*	5 (1,3)	4 (2,0)
*A*31*	7 (1,8)	6 (3,0)
*A*32*	13 (3,4)	5 (2,5)
*A*33*	7 (1,8)	4 (2,0)
*A*66*	2 (0,5)	0
*A*68*	15 (3,9)	2 (1,0)
*A*80*	1 (0,3)	0

HLA - humani leukocitni antigeni; N- broj pojedinih alela; AA- skupina bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG, χ^2=113,55; p=0,167

Najčešće zastupljeni aleli lokusa HLA-A u skupini AA su bili HLA-A*02 (36,0%), HLA-A*01 (14,5%), HLA-A*03 (14,0%) i HLA-A*24 (9,0%). U kontrolnoj skupini najčešći alel lokusa HLA-A bio je HLA-A*02 (29,7%), a slijedili su HLA-A*03 (16,6%), HLA-A*24 (11,3%) i HLA-A*01 (10,3%). Na lokusu HLA-A je učinjena usporedba vrijednosti χ^2 testom za neovisne uzorke i nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih alela između skupine AA i kontrolne skupine (χ^2=113,56; p=0,167). U skupini AA u usporedbi s kontrolnom skupinom uočena je češća zastupljenost alela HLA-A*02 (36,0% u AA skupini prema 29,7% u kontrolnoj skupini, p=0,122).

U skupini bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG nađena su 23 različita alela lokusa HLA-B i 25 u kontrolnoj skupini (Tablica 24.) te je uspoređeno 26 alela. Najčešće zastupljeni aleli lokusa HLA-B u skupini AA su bili HLA-B*35 (14,5%), HLA-B*08 (10,0%) i HLA-B*51 (9,5%). U kontrolnoj skupini najčešći HLA-B aleli su bili HLA-B*51 (12,9%), HLA-B*35 (10,8%), HLA-B*07 (9,7%) i HLA-B*18 (9,5%). Na lokusu HLA-B je učinjena usporedba vrijednosti χ^2 testom za neovisne uzorke i nije uočena statistički značajna razlika između pojedinih alela AA skupine i kontrolne skupine (χ^2=228,56; p=0,181). U skupini AA je uočena manja učestalost alela HLA-B*18 (p=0,094) i HLA-B*51 (p=0,227) te veća učestalost alela HLA-B*35 (p=0,194). U skupini AA u usporedbi s kontrolnom skupinom su značajno češće bili zastupljeni aleli HLA-B*08 (10,0% u AA u odnosu na 5,5% u kontrolnoj skupini, p=0,044) i HLA-B*57 (7,5% u AA skupini prema 1,6% u kontrolnoj skupini, p=0,0003, OR 5,05, 95% CI 1,93 - 13,24). Nakon korekcije samo alel HLA-B*57 je i dalje statistički značajno češći u skupini AA (p_k=0,008) (Tablica 24.).

U skupini bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG nađeno je 12 različitih alela lokusa HLA-C i 14 u kontrolnoj skupini (Tablica 25.). Najčešće zastupljeni aleli lokusa HLA-C u skupini AA bili su HLA-C*07 (30,0%), HLA-C*04 (17,5%), HLA-C*06 (12,5%) i HLA-C*12 (11,5%). U kontrolnoj skupini najčešći HLA-C aleli bili su HLA-C*07 (26,6%), HLA-C*12 (17,9) i HLA-C*04 (11,1%). Na lokusu HLA-C je učinjena usporedba vrijednosti χ^2 testom za neovisne uzorke i nije uočena statistički značajna razlika između pojedinih alela AA skupine i kontrolne skupine (χ^2=88,00; p=0,279). U skupini AA je nađena veća učestalost alela HLA-C*04 (17,5% u skupini AA u odnosu na 11,1% u kontrolnoj skupini) (p=0,031, OR 1,71, 95% CI 1,05-2,77) i HLA-C*06 (12,5% u skupini AA u odnosu na 6,8% u kontrolnoj skupini) (p=0,021, OR 1,95, 95% CI 1,09 - 3,47).

Tablica 24. Učestalost alela lokusa HLA-B u skupini AA (N=200) u odnosu na učestalost istog alela kod ispitanika kontrolne skupine (N=380).

Aleli lokusa HLA-B	**Kontrolna skupina N (%)**	**AA N (%)**	**Aleli lokusa HLA-B**	**Kontrolna skupina N (%)**	**AA N (%)**
*B*07*	37 (9,7)	16 (8,0)	*B*44*	31 (8,2)	17 (8,5)
*B*08*	21 (5,5)	20 (10,0)	*B*47*	3 (0,8)	1 (0,5)
*B*13*	9 (2,4)	7 (3,5)	*B*48*	0	1 (0,5)
*B*14*	7 (1,8)	4 (2,0)	*B*49*	14 (3,7)	3 (1,5)
*B*15*	17 (4,5)	7 (3,5)	*B*50*	7 (1,8)	3 (1,5)
*B*18*	36 (9,5)	11 (5,5)	*B*51*	49 (12,9)	19 (9,5)
*B*27*	23 (6,1)	11 (5,5)	*B*52*	6 (1,6)	5 (2,5)
*B*35*	41 (10,8)	29 (14,5)	*B*53*	1 (0,3)	0
*B*37*	1 (0,2)	0	*B*54*	1 (0,3)	0
*B*38*	21 (5,5)	6 (3,0)	*B*55*	2 (0,5)	5 (2,5)
*B*39*	14 (3,7)	6 (3,0)	*B*56*	6 (1,6)	3 (1,5)
*B*40*	16 (4,2)	8 (4,0)	*B*57*	6 (1,6)	15 (7,5)
*B*41*	7 (1,8)	1 (0,5)	*B*58*	4 (1,1)	2 (1,0)

HLA - humani leukocitni antigeni; N- broj pojedinih alela; AA- skupina bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG; χ^2=228,56; p=0,181; crveno - značajno za raspravu, za B*57 p=0,0003, p_k=0,008

Za alel HLA-C*12 nađena je značajno manja učestalost u skupini AA (11,5% u skupini AA u odnosu na 17,9% u kontrolnoj skupini) (p=0,044, OR 0,60, 95% CI 0,36-0,99). Nakon korekcije navedene razlike više nisu bile statistički značajne, a korigirane p vrijednosti bile su za HLA-C*04 (p_k=0,357), HLA-C*06 (p_k=0,257) i HLA-C*12 (p_k=1,000), (Tablica 25.).

Tablica 25. Učestalost alela lokusa HLA-C u skupini bolesnoj AA (N=200) u odnosu učestalost istog alela kod ispitanika kontrolne skupine (N=380).

Aleli lokusa HLA-C	Kontrolna skupina N (%)	AA N (%)
*C*01*	14 (3,7)	11 (5,5)
*C*02*	33 (8,7)	10 (5,0)
*C*03*	31 (8,2)	17 (8,5)
*C*04*	42 (11,1)	35 (17,5)
*C*05*	14 (3,7)	3 (1,5)
*C*06*	26 (6,8)	25 (12,5)
*C*07*	101 (26,6)	60 (30,0)
*C*08*	6 (1,6)	4 (2,0)
*C*12*	68 (17,9)	23 (11,5)
*C*13*	1 (0,3)	0
*C*14*	14 (3,7)	5 (2,5)
*C*15*	18 (4,7)	4 (2,0)
*C*16*	7 (1,8)	3 (1,5)
*C*17*	5 (1,3)	0

HLA - humani leukocitni antigeni; N- broj pojedinih alela; AA- skupina bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG; χ^2= 88,00; p=0,279

4.2. Aleli HLA razreda II - skupina AA *vs* kontrolna skupina

Ispitanicima s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG određeni su aleli sustava HLA razreda II za lokuse DRB1, DQA1 i DQB1, prvo u niskoj rezoluciji (na razini alelne skupine). Zbog visoke polimorfnosti lokusa DRB1, DQA1 i DQB1 učinjeno je testiranje i u visokoj rezoluciji (na razini pojedinog alela). Za svaki lokus provedena je usporedba s podacima dobivenim testiranjem ispitanika kontrolne skupine, a uočene razlike u učestalostima (frekvencijama) pojedinih alela analizirane su χ^2 testom. U niskoj rezoluciji je u obje skupine nađeno i uspoređeno 13 različitih alela HLA-DRB1 (Tablica 26.). Najčešće zastupljeni aleli DRB1 u skupini AA su bili DRB1*11 (21,0%), DRB1*03 (13,5%), DRB1*07 (12,0%), DRB1*15 (9,0%) i DRB1*16 (9,0%). U kontrolnoj skupini najčešći DRB1 aleli su bili

DRB1*11 (18,7%), DRB1*01 (11,6%) DRB1*13 (11,3%), DRB1*16 (11,3%) i DRB1*03 (9,7%).

Tablica 26. Učestalost alela lokusa HLA-DRB1 u skupini AA (N=200) u odnosu na učestalost istog alela kod ispitanika kontrolne skupine (N=380), na razini niske rezolucije.

Aleli lokusa HLA-DRB1	**Kontrolna skupina N (%)**	**AA N (%)**
*DRB1*01*	44 (11,6)	13 (6,5)
*DRB1*03*	37 (9,7)	27 (13,5)
*DRB1*04*	31 (8,2)	16 (8,0)
DRB1*07	**24 (6,3)**	**24 (12,0)**
*DRB1*08*	20 (5,3)	10 (5,0)
*DRB1*09*	1 (0,3)	2 (1,0)
*DRB1*10*	6 (1,6)	3 (1,5)
*DRB1*11*	71 (18,7)	42 (21,0)
*DRB1*12*	8 (2,1)	2 (1,0)
*DRB1*13*	43 (11,3)	14 (7,0)
*DRB1*14*	15 (3,9)	11 (5,5)
*DRB1*15*	37 (9,7)	18 (9,0)
*DRB1*16*	43 (11,3)	18 (9,0)

HLA - humani leukocitni antigeni; N- broj pojedinih alela; AA- skupina bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG; χ^2= 110,50; p= 0,222, crno - alel važan za raspravu

Usporedbom frekvencija pojedinih alela nije uočena statistički značajna razlika (χ^2= 110,50; p= 0,222). Uočena je veća učestalost alela DRB1*03 (p=0,165) i DRB1*11 (p=0,507) u skupini AA u odnosu na kontrolnu skupinu. Veća učestalost alela DRB1*01 opažena u kontrolnoj skupini (11,6%) u odnosu na 6,5% u skupini AA, bila je na granici statističke značajnosti (p=0,050), ali se ta značajnost izgubila nakon korekcije (p_k=0,487). U skupini AA nađena je statistički značajno veća učestalost alela DRB1*07 (12,0% u skupini AA u odnosu na 6,3% u kontrolnoj skupini) (p=0,018, OR 2,02, 95% CI 1,12-3,66), no ne i nakon korekcije (p_k=0,210).

U visokoj rezoluciji, u skupini bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG nađeno je 30 različitih alela lokusa HLA-DRB1 i 33 u kontrolnoj skupini (Tablica 27.) te je uspoređeno ukupno 38 alela između dviju skupina.

Tablica 27. Učestalost alela lokusa HLA-DRB1 u skupini AA (N=200) u odnosu na učestalost istog alela kod ispitanika kontrolne skupine (N=380), na razini visoke rezolucije.

Aleli lokusa HLA-DRB1	**Kontrolna skupina N (%)**	**AA N (%)**	**Aleli lokusa HLA-DRB1**	**Kontrolna skupina N (%)**	**AA N (%)**
*DRB1*01:01*	36 (9,5)	11 (5,5)	*DRB1*11:03*	3 (0,8)	1 (0,5)
*DRB1*01:02*	5 (1,3)	2 (1,0)	*DRB1*11:04*	29 (7,6)	21 (10,5)
*DRB1*01:03*	3 (0,8)	0	*DRB1*11:11*	1 (0,3)	0
*DRB1*03:01*	37 (9,7)	27 (13,5)	*DRB1*11:12*	0	1 (0,5)
*DRB1*04:01*	13 (3,4)	5 (2,5)	*DRB1*11:13*	0	1 (0,5)
*DRB1*04:02*	7 (1,8)	2 (1,0)	*DRB1*12:01*	8 (2,1)	2 (1,0)
*DRB1*04:03*	2 (0,5)	0	*DRB1*13:01*	24 (6,3)	7 (3,5)
*DRB1*04:04*	7 (1,8)	6 (3,0)	*DRB1*13:02*	16 (4,2)	7 (3,5)
*DRB1*04:05*	1 (0,3)	2 (1,0)	*DRB1*13:03*	2 (0,5)	0
*DRB1*04:07*	1 (0,3)	1 (0,5)	*DRB1*13:05*	1 (0,3)	0
DRB1*07:01	**24 (6,3)**	**24 (12,0)**	*DRB1*14:01*	4 (1,1)	4 (2,0)
*DRB1*08:01*	13 (3,4)	8 (4,0)	*DRB1*14:05*	1 (0,3)	0
*DRB1*08:03*	0	1 (0,5)	*DRB1*14:08*	1 (0,3)	0
*DRB1*08:04*	6 (1,6)	1 (0,5)	*DRB1*14:54*	9 (2,4)	7 (3,5)
*DRB1*08:12*	1 (0,3)	0	*DRB1*15:01*	34 (8,9)	14 (7,0)
*DRB1*09:01*	1 (0,3)	2 (1,0)	*DRB1*15:02*	3 (0,8)	3 (1,5)
*DRB1*10:01*	6 (1,6)	3 (1,5)	*DRB1*15:03*	0	1 (0,5)
*DRB1*11:01*	38 (10,0)	17 (8,5)	*DRB1*16:01*	37 (9,7)	17 (8,5)
*DRB1*11:02*	0	1 (0,5)	*DRB1*16:02*	6 (1,6)	1 (0,5)

HLA - humani leukocitni antigeni; N- broj pojedinih alela; AA- skupina bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG, crno - alel važni za raspravu

Najčešći aleli lokusa DRB1 u skupini AA su bili DRB1*03:01 (13,5%), DRB1*07:01 (12,0%), DRB1*11:04 (10,5%), DRB1*11:01 (8,5%) i DRB1*16:01 (8,5%). U kontrolnoj skupini najčešći aleli lokusa DRB1 su bili DRB1*11:01 (10,0%), DRB1*03:01 (9,7%), DRB1*16:01 (9,7%), DRB1*01:01 (9,5%) i DRB1*15:01 (8,9%). Usporedbom učestalosti pojedinih alela nisu uočeni aleli s razlikom većom od 5% osim alel DRB1*07:01 (visoka rezolucija), koji je jedini alel u alelnoj skupini DRB1*07 (niska rezolucija).

U niskoj rezoluciji je u obje skupine (AA i kontrolna skupina) nađeno i uspoređeno 6 različitih alela HLA-DQA1 (Tablica 28.). Najčešće zastupljeni aleli lokusa HLA-DQA1 u obje skupine su bili DQA1*01 (39,5% u AA i 48,7% u kontrolnoj skupini) i DQA1*05 (34,5% u AA skupini i 32,1% u kontrolnoj skupini). Na 3. mjestu u AA skupini je alel DQA1*02 (12,0%), a u kontrolnoj skupini gen HLA-DQA1*03 (8,9%). Na lokusu HLA-DQA1 nije uočena statistički značajna razlika, na razini niske rezolucije, između skupine AA i kontrolne skupine (χ^2= 30,00; p= 0,224). U skupini AA u usporedbi s kontrolnom skupinom statistički je značajno češće zastupljen alel DQA1*02 (12% u AA skupini prema 6,3% u kontrolnoj skupini) (p=0,018, OR 2,02, 95% CI 1,11-3,66) i značajno rjeđe alel DQA1*01 (39,5% u AA skupini prema 48,7% u kontrolnoj skupini), ali nakon korekcije češća zastupljenost više nije bila statistički značajna (za DQA1*02 p_k=0,103, a za DQA1*01 p_k=0,193). U visokoj rezoluciji, u skupini AA nađeno je 14 različitih alela lokusa HLA-DQA1 i 15 u kontrolnoj skupini (Tablica 29.). Najčešći aleli lokusa HLA-DQA1 u skupini AA su bili redom: DQA1*05:05 (20,5%), DQA1*01:02 (20,0%) i DQA1*05:01 (14,0%). U kontrolnoj skupini najčešći aleli su bili DQA1*01:02 (25,0%), DQA1*05:05 (20,5%), DQA1*05:01 (11,1%) i DQA1*01:01 (11,1%). Nisu uočeni aleli s razlikom većom od 5% osim alel DQA1*02:01 (visoka rezolucija), koji je jedini alel u alelnoj skupini DQA1*02 (niska rezolucija).

Na lokusu HLA-DQB1, u niskoj rezoluciji, u obje skupine nađeno je 5 alela (Tablica 30.). Najzastupljeniji alel (u niskoj rezoluciji) u obje skupine bio je DQB1*03 (33,4% u kontrolnoj skupini i 34,5% u skupini AA). Slijedeći je bio DQB1*05 (27,9% u kontrolnoj skupini i 23,0% u skupini AA). Na 3. mjestu u AA skupini bio je alel DQB1*02 (21,5%), a u kontrolnoj skupini alel HLA-DQB1*06 (20,0%). Najmanje zastupljen alel u obje skupine bio je DQB1*04.

Usporedbom kontrolne skupine i skupine AA, na razini niske rezolucije nisu nađene statistički značajne razlike u učestalosti alela DQB1 (χ^2= 20,00; p= 0,220). U skupini AA u usporedbi s kontrolnom skupinom najveća je razlika u učestalosti uočena za alel DQB1*02 (21,5% u AA skupini prema 15,5% u kontrolnoj skupini), ali nije bila statistički značajna (p=0,071).

Tablica 28. Učestalost alela lokusa HLA-DQA1 u skupini AA (N=200) u odnosu na učestalost istog alela kod ispitanika kontrolne skupine (N=380), na razini niske rezolucije.

Aleli lokusa HLA-DQA1	**Kontrolna skupina N (%)**	**AA N (%)**
DQA1*01	**185 (48,7)**	**79 (39,5)**
DQA1*02	**24 (6,3)**	**24 (12,0)**
*DQA1*03*	34 (8,9)	18 (9,0)
*DQA1*04*	14 (3,7)	9 (4,5)
*DQA1*05*	122 (32,1)	69 (34,5)
*DQA1*06*	1 (0,3)	1 (0,5)

HLA - humani leukocitni antigeni; N- broj pojedinih alela; AA- skupina bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG; χ^2= 30,00; p= 0,224, crno - aleli važni za raspravu

Tablica 29. Učestalost alela lokusa HLA-DQA1 u skupini AA (N=200) u odnosu na učestalost istog alela kod ispitanika kontrolne skupine (N=380), na razini visoke rezolucije.

Aleli lokusa HLA-DQA1	**Kontrolna skupina N (%)**	**AA N (%)**	**Aleli lokusa HLA-DQA1**	**Kontrolna skupina N (%)**	**AA N (%)**
*DQA1*01:01*	42 (11,1)	13 (6,5)	*DQA1*03:03*	10 (2,6)	4 (2,0)
*DQA1*01:02*	95 (25,0)	40 (20,0)	*DQA1*04:01*	14 (3,7)	8 (4,0)
*DQA1*01:03*	26 (6,8)	11 (5,5)	*DQA1*04:02*	0	1 (0,5)
*DQA1*01:04*	16 (4,2)	12 (6,0)	*DQA1*05:01*	42 (11,1)	28 (14,0)
*DQA1*01:05*	6 (1,6)	3 (1,5)	*DQA1*05:02*	1 (0,3)	0
DQA1*02:01	**24 (6,3)**	**24 (12,0)**	*DQA1*05:03*	1 (0,3)	0
*DQA1*03:01*	23 (6,1)	12 (6,0)	*DQA1*05:05*	78 (20,5)	41 (20,5)
*DQA1*03:02*	1 (0,3)	2 (1,0)	*DQA1*06:01*	1 (0,3)	1 (0,5)

HLA - humani leukocitni antigeni; N- broj pojedinih alela; AA- skupina bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG, crno - alel važni za raspravu

U visokoj rezoluciji, u skupini AA nađeno je 14 različitih alela lokusa HLA-DQB1 i 16 u kontrolnoj skupini (Tablica 31.). Između dviju skupina, χ^2 testom je uspoređena učestalost 17 DQB1 alela te nije utvrđena statistički značajna razlika (χ^2= 143,00; p= 0,242).

Najčešći aleli lokusa HLA-DQB1 u skupini AA su bili DQB1*03:01 (21,5%), DQB1*02:01 (15,0%), DQB1*05:02 (9,0%) i DQB1*05:01 (8,5%). U kontrolnoj skupini najčešći aleli lokusa HLA-DQB1 su bili DQB1*03:01 (24,4%), DQB1*05:01 (13,4%), DQB1*05:02 (11,1%) i DQB1*02:01 (10,3%). U skupini AA uočena je veća učestalost alela DQB1*02:01 (15,5% u skupini AA u odnosu na 10,3% u kontrolnoj skupini), ali bez statističke značajnosti (p=0,097). U skupini AA nađena je statistički značajno veća učestalost alela DQB1*03:03 (6,5% u skupini AA u odnosu na 1,3% u kontrolnoj skupini) (**p=0,001**, **p_k=0,017**, OR **5,21**, 95% CI 1,83 - 14,84) (Tablica 31.)

Tablica 30. Učestalost alela lokusa HLA-DQB1 u skupini AA (N=200) u odnosu na učestalost istog alela kod ispitanika kontrolne skupine (N=380), na razini niske rezolucije.

Aleli lokusa HLA-DQB1	**Kontrolna skupina N (%)**	**AA N (%)**
*DQB1*02*	59 (15,5)	43 (21,5)
*DQB1*03*	127 (33,4)	69 (34,5)
*DQB1*04*	12 (3,2)	9 (4,5)
*DQB1*05*	106 (27,9)	46 (23,0)
*DQB1*06*	76 (20,0)	33 (16,5)

HLA - humani leukocitni antigeni; N- broj pojedinih alela; AA- skupina bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG; χ^2= 20,00; p= 0,220

Tablica 31. Učestalost alela lokusa HLA-DQB1 u skupini AA (N=200) u odnosu na učestalost istog gena kod ispitanika kontrolne skupine (N=380).

Aleli lokusa HLA-DQB1	**Kontrolna skupina N (%)**	**AA N (%)**
*DQB1*02:01*	39 (10,3)	30 (15,0)
*DQB1*02:02*	20 (5,3)	13 (6,5)
*DQB1*03:01*	93 (24,4)	43 (21,5)
*DQB1*03:02*	23 (6,1)	13 (6,5)
DQB1*03:03	**5 (1,3)**	**12 (6,5)**
*DQB1*03:04*	4 (1,1)	0
*DQB1*03:07*	2 (0,5)	0
*DQB1*03:19*	0	1 (0,5)
*DQB1*04:02*	12 (3,2)	9 (4,5)
*DQB1*05:01*	51 (13,4)	17 (8,5)
*DQB1*05:02*	42 (11,1)	18 (9,0)
*DQB1*05:03*	13 (3,4)	11 (5,5)
*DQB1*06:01*	3 (0,8)	3 (1,5)
*DQB1*06:02*	33 (8,7)	14 (7,0)
*DQB1*06:03*	26 (6,8)	10 (5,0)
*DQB1*06:04*	10 (2,6)	6 (3,0)
*DQB1*06:09*	4 (1,1)	0

HLA - humani leukocitni antigeni; N- broj pojedinih alela; AA- skupina bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG; χ^2= 143,00; p= 0,242; za *DQB1*03:03* p=0,001, p_k=0,017

4.3. Pretpostavljene haplotipske sveze - skupina AA *vs.* kontrolna skupina

Zbog neravnoteže vezanja pojedinih alela dvaju ili više lokusa učinjena je usporedba alela te analiza haplotipova radi moguće povezanosti s nastankom antieritrocitnih autoprotutijela razreda IgG.

Nađeno je ukupno 79 različitih haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 (Tablica 32.), koje se sastoje od 38 DRB1 alela, 16 DQA1 alela i 17 DQB1 alela.

U skupini AA otkriveno je 39 haplotipskih sveza, a u kontrolnoj skupini 65.

Haplotipskih sveza koje su se pojavile samo jednom, bilo je u skupini AA 20 (10,0%), a u kontrolnoj skupini 34 (8,9%). Usporedbom haplotipskih sveza između skupine AA i kontrolne skupine nisu uočene statistički značajne razlike (χ^2=168,28; p=0,204).

Najčešća haplotipska sveza DRB1-DQA1-DQB1 u skupini AA je DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (13,5%), a u kontrolnoj skupini je DRB1*11:01-DQA1*05:05-DQB1*03:01 (10,0%).

Slijedeće po učestalosti u AA skupini su: DRB1*11:04-DQA1*05:05-DQB1*03:01 (9,5%), DRB1*11:01-DQA1*05:05-DQB1*03:01 (8,5%), DRB1*16:01-DQA1*01:02-DQB1*05:02 (8,5%), DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02 (7,0%), DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*03:03 (6,0%), DRB1*01:01-DQA1*01:01-DQB1*05:01 (5,5%), i DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*02:02 (5,5%).

Slijedeće najčešće haplotipske sveze u kontrolnoj skupini su: DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (9,7%), DRB1*01:01-DQA1*01:01-DQB1*05:01 (9,5%), DRB1*16:01-DQA1*01:02-DQB1*05:02 (8,7%), DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02 (8,7%), DRB1*11:04-DQA1*05:05-DQB1*03:01 (6,6%), DRB1*13:01-DQA1*01:03-DQB1*06:03 (5,8%) i DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*02:02 (5,0%).

U skupini AA dobivena je statistički značajno veća učestalost haplotipskih sveza DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*03:03 (p=0,001; OR 6,00, 95%CI (1,91 - 18,86), ali se nakon korekcije u odnosu na ukupan broj različitih haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 (n=79) statistička značajnost izgubila (p_k=0,076).

4.4. Aleli HLA razreda I - usporedba skupina AIHA, AP i kontrolne skupine

Usporedba rezultata nakon dodatne podjele skupine bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima na podskupine: bolesnici s kliničkim pokazateljima autoimune hemolitičke anemije (AIHA) i bolesnici i trudnice s autoprotutijelima, ali bez kliničke slike hemolize (AP) prikazana je u Tablici 33. za lokus HLA-A, u Tablici 34. za lokus HLA-B, u Tablici 35. za lokus HLA-C. Usporedbom učestalosti alela lokusa HLA-A i HLA-C između pojedinih skupina AIHA, AP i kontrolne skupine nije uočena statistički značajna razlika.

S obzirom na dobivenu veću učestalost alela B*57 na lokusu HLA-B u skupini AIHA, učinjena je usporedba gena HLA-B lokusa (Tablica 34.) i nije uočena statistički značajna razlika između promatranih skupina: AIHA *vs* kontrolna skupina χ^2=102,75; p=0,188, AP *vs* kontrolna skupina

χ^2=125,25; p=0,601, AP *vs* AIHA χ^2=86,38; p=0,089. Naknadno je analizirana učestalost alela HLA-B*57 te je nađena statistički značajna razlika u skupini AIHA (**p=0,0001**, OR 14,7, 95% CI 4,81 - 44,74) i AP (p=0,010, OR 4,00, 95% CI 1,32 - 12,16) u odnosu na kontrolnu skupinu za alel HLA-B*57. Nakon korekcije u skupini AIHA i dalje je vidljiva statistički značajna razlika (**p_k=0,005**), dok se u skupini AP statistička značajnost izgubila (p_k=0,407)

Tablica 32. Učestalost najčešćih haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u skupini AA (N=200) i u kontrolnoj skupini KS (N=380).

DRB1-DQA1-DQB1	**KS**	**AA**	***DRB1-DQA1-DQB1***	**KS**	**AA**
	N (%)	**N (%)**		**N (%)**	**N (%)**
01:01-01:01-05:01	36 (9,5)	11 (5,5)	*11:01-05:05-03:01*	38 (10,0)	17 (8,5)
01:02-01:01-05:01	4 (1,1)	2 (1,0)	*11:03-05:05-03:01*	3 (0,8)	1 (0,5)
03:01-05:01-02:01	37 (9,7)	27 (13,5)	*11:04-05:05-03:01*	25 (6,6)	19 (9,5)
04:01-03:01-03:02	5 (1,3)	4 (2,0)	*12:01-05:05-03:01*	8 (2,1)	2 (1,0)
04:02-03:01-03:02	6 (1,6)	1 (0,5)	*13:01-01:03-06:03*	22 (5,8)	7 (3,5)
04:04-03:01-03:02	5 (1,3)	6 (3,0)	*13:02-01:02-06:04*	10 (2,6)	6 (3,0)
07:01-02:01-02:02	19 (5,0)	11 (5,5)	*14:54-01:04-05:03*	9 (2,4)	6 (3,0)
07:01-02:01-03:03	4 (1,1)	12 (6,0)	*15:01-01:02-06:02*	33 (8,7)	14 (7,0)
08:01-04:01-04:02	7 (1,8)	7 (3,5)	*15:02-01:03-06:01*	3 (0,8)	3 (1,5)
08:04-04:01-04:02	3 (0,8)	1 (0,5)	*16:01-01:02-05:02*	33 (8,7)	17 (8,5)
10:01-01:05-05:01	6 (1,6)	2 (1,0)	*16:02-01:02-05:02*	5 (1,3)	1 (0,5)

N- broj pojedinih haplotipskih sveza; AA- skupina bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG; plavo- haplotipske sveze u kojima je vezan alel DRB1*07:01; χ^2=168,28; p=0,204

4.5. Aleli HLA razreda II - usporedba skupina AIHA, AP i kontrolne skupine

Usporedbom frekvencija pojedinih alela lokusa DRB1 (Tablica 36.) i DQA1 (Tablica 37.) između skupina AIHA i AA s frekvencijama alela u kontrolnoj skupini nisu uočene značajne razlike (Tablica 36.). Veća učestalost alela DRB1*07:01 u AIHA skupini (13,1%) u odnosu na kontrolnu skupinu (6,3%) bila je statistički značajna samo do korekcije (p=0,033, P_k=0,922). Najčešći aleli lokusa DQA1 u skupinama AIHA, AP i kontrolnoj skupini su bili DQA1*05:05,

DQA1*05:01 i DQA1* 01:02, s različitim frekvencijama alela (Tablica 37.). U skupini AIHA nađena je statistički značajno veća učestalost alela HLA-DQA1*02:01 (13,1%), u odnosu na kontrolnu skupinu (6,3%), ali korekcijom p vrijednosti izgubila se statistička značajnost (p=0,033, p_k=0,658).

Tablica 33. Učestalost alela lokusa HLA-A u skupini AIHA (N=84) i u skupini AP (N=116) u odnosu na učestalost istog alela kod ispitanika kontrolne skupine (N=380).

Aleli lokusa HLA-A	**Kontrolna skupina N (%)**	**AIHA N (%)**	**AP N (%)**
*A*01*	39 (10,3)	14 (16,7)	15 (12,9)
*A*02*	113 (29,7)	33 (39,3)	39 (33,6)
*A*03*	63 (16,6)	13 (15,5)	15 (12,9)
*A*11*	31 (8,2)	3 (3,6)	9 (7,8)
*A*23*	7 (1,8)	1 (1,2)	4 (3,4)
*A*24*	43 (11,3)	2 (2,4)	16 (13,8)
*A*25*	15 (3,9)	4 (4,8)	1 (0,9)
*A*26*	16 (4,2)	5 (6,0)	4 (3,4)
*A*29*	3 (0,8)	1 (1,2)	0
*A*30*	5 (1,3)	2 (2,4)	2 (1,7)
*A*31*	7 (1,8)	1 (1,2)	4 (3,4)
*A*32*	13 (3,4)	1 (1,2)	4 (3,4)
*A*33*	7 (1,8)	2 (2,4)	2 (1,7)
*A*66*	2 (0,5)	0	0
*A*68*	15 (3,9)	1 (1,2)	1 (0,9)
*A*80*	1 (0,3)	0	0

HLA - humani leukocitni antigeni, N- broj pojedinih alela, AIHA - bolesnici sa znakovima hemolize, AP - bolesnici i trudnice bez dokazane hemolize; AIHA *vs* kontrolna skupina χ^2=77,82; p=0,099, AP *vs* kontrolna skupina χ^2=71,50; p=0,056, AP *vs* AIHA χ^2=57,69; p=0,054

Tablica 34. Učestalost najčešćih alela lokusa HLA-B u skupini AIHA (N=84) i u skupini AP (N=116) u odnosu na učestalost istog alela kod ispitanika kontrolne skupine (N=380).

Aleli lokusa HLA-B	**Kontrolna skupina N (%)**	**AIHA N (%)**	**AP N (%)**
*B*07*	37 (9,7)	8 (9,5)	8 (6,9)
B*08	**21 (5,5)**	**10 (11,9)**	**10 (8,6)**
*B*13*	9 (2,4)	2 (2,4)	5 (4,3)
*B*14*	7 (1,8)	1 (1,2)	3 (2,6)
*B*15*	17 (4,5)	2 (2,4)	5 (4,3)
*B*18*	36 (9,5)	3 (3,6)	8 (6,9)
*B*27*	23 (6,1)	3 (3,6)	8 (6,9)
*B*35*	41 (10,8)	11 (13,1)	18 (15,5)
*B*38*	21 (5,5)	2 (2,4)	4 (3,4)
*B*39*	14 (3,7)	3 (3,6)	3 (2,6)
*B*40*	16 (4,2)	5 (6,0)	3 (2,6)
*B*44*	31 (8,2)	8 (9,5)	9 (7,8)
*B*49*	14 (3,7)	2 (2,4)	1 (0,9)
*B*51*	49 (12,9)	7 (8,3)	12 (10,3)
*B*52*	6 (1,6)	3 (3,6)	2 (1,7)
*B*55*	2 (0,5)	2 (2,4)	3 (2,6)
*B*56*	6 (1,6)	2 (2,4)	1 (0,9)
B*57	**6 (1,6)**	**8 (9,5)†**	**7 (6,0)‡**

HLA - humani leukocitni antigeni, N- broj pojedinih alela, AIHA - bolesnici sa znakovima hemolize, AP - bolesnici i trudnice bez dokazane hemolize, p_k - korigirana p vrijednost;†p_k=0,005, ‡p_k=0,407, crveno - podaci važni za raspravu

Usporedbom učestalosti alela lokusa HLA-DQB1 nisu uočene statistički značajne razlike između skupina AIHA, AP i kontrolne skupine (Tablica 38.).

Na lokusu DQB1 nađeno je nekoliko alela čije su frekvencije između skupine AIHA i kontrolne skupine pokazale značajne razlike do korekcije p vrijednosti (Tablica 38.).

Veća učestalost alela DQB1*03:03 u skupini AIHA (p=0,007) i u skupini AP (p=0,004) u odnosu na kontrolnu skupinu nakon korekcije više nije bila statistički značajna (p_k=0,213 za AIHA skupinu i p_k=0,127 za AP skupinu).

Tablica 35. Učestalost alela lokusa HLA-C u skupini AIHA (N=84) i u skupini AP (N=116) u odnosu na učestalost istog alela kod ispitanika kontrolne skupine (N=380).

Aleli lokusa HLA-C	**Kontrolna skupina N (%)**	**AIHA N (%)**	**AP N (%)**
*C*01*	14 (3,7)	4 (4,8)	7 (6,0)
*C*02*	33 (8,7)	4 (4,8)	6 (5,2)
*C*03*	31 (8,2)	8 (9,5)	9 (7,8)
*C*04*	42 (11,1)	14 (16,7)	21 (18,1)
*C*05*	14 (3,7)	1 (1,2)	2 (1,7)
C*06	**26 (6,8)**	**11 (13,1)**	**15 (12,9)**
*C*07*	101 (26,6)	27 (32,1)	32 (27,6)
*C*08*	6 (1,6)	1 (1,2)	3 (2,6)
*C*12*	68 (17,9)	10 (11,9)	13 (11,2)
*C*13*	1 (0,3)	0	0
*C*14*	14 (3,7)	2 (2,4)	3 (2,6)
*C*15*	18 (4,7)	1 (1,2)	3 (2,6)
*C*16*	7 (1,8)	1 (1,2)	2 (1,7)
*C*17*	5 (1,3)	0	0

HLA - humani leukocitni antigeni, N- broj pojedinih alela, AIHA - bolesnici sa znakovima hemolize, AP - bolesnici i trudnice bez dokazane hemolize, p- vjerojatnost; AIHA *vs* kontrolna skupina χ^2=63,56; p=0,228, AP *vs* kontrolna skupina χ^2=70,89; p=0,259, AP *vs* AIHA χ^2=67,22; p=0,145.

Tablica 36. Učestalost najčešćih alela lokusa HLA-DRB1 u skupini AIHA (N=84) i u skupini AP (N=116) u odnosu na učestalost istog gena kod ispitanika kontrolne skupine (N=380).

Aleli lokusa HLA-DRB1	**Kontrolna skupina N (%)**	**AIHA N (%)**	**AP N (%)**
*DRB1*01:01*	36 (9,5)	3 (3,6)	8 (6,9)
*DRB1*03:01*	37 (9,7)	13 (15,5)	14 (12,1)
*DRB1*04:01*	13 (3,4)	2 (2,4)	3 (2,6)
*DRB1*04:02*	7 (1,8)	1 (1,2)	1 (0,9)
*DRB1*04:04*	7 (1,8)	2 (2,4)	4 (3,4)
DRB1*07:01	**24 (6,3)**	**11 (13,1)**	13 (11,2)
*DRB1*08:01*	13 (3,4)	5 (6,0)	3 (2,6)
*DRB1*09:01*	1 (0,3)	1 (1,2)	1 (0,9)
*DRB1*11:01*	38 (10,0)	8 (9,5)	9 (7,8)
*DRB1*11:04*	29 (7,6)	7 (8,3)	14 (12,1)
*DRB1*13:01*	24 (6,3)	2 (2,4)	5 (4,3)
*DRB1*13:02*	16 (4,2)	4 (4,8)	3 (2,6)
*DRB1*14:01*	4 (1,1)	3 (3,6)	1 (0,9)
*DRB1*14:54*	9 (2,4)	3 (3,6)	4 (3,4)
*DRB1*15:01*	34 (8,9)	5 (6,0)	9 (7,8)
*DRB1*15:02*	3 (0,8)	1 (1,2)	2 (1,7)
*DRB1*16:01*	37 (9,7)	8 (9,5)	9 (7,8)

HLA - humani leukocitni antigeni, N- broj pojedinih alela, AIHA - bolesnici sa znakovima hemolize, AP - bolesnici i trudnice bez dokazane hemolize, AIHA *vs* kontrolna skupina χ^2=99,17; p=0,392, AP *vs* kontrolna skupina χ^2=104,83; p=0,252, AP *vs* AIHA χ^2=73,67; p=0,191.

Tablica 37. Učestalost najčešćih alela lokusa HLA-DQA1 u skupini AIHA (N=84) i u skupini AP (N=116) u odnosu na učestalost istog alela kod ispitanika kontrolne skupine (N=380).

Aleli lokusa HLA-DQA1	**Kontrolna skupina N (%)**	**AIHA N (%)**	**AP N (%)**
*DQA1*01:01*	42 (11,1)	4 (4,8)	10 (8,6)
*DQA1*01:02*	95 (25,0)	18 (21,4)	22 (19,0)
*DQA1*01:03*	26 (6,8)	3 (3,6)	8 (6,9)
*DQA1*01:04*	16 (4,2)	7 (8,3)	5 (4,3)
*DQA1***02:01*	**24 (6,3)**	**11 (13,1)**	13 (11,2)
*DQA1*03:01*	23 (6,1)	4 (4,8)	8 (6,9)
*DQA1*03:02*	1 (0,3)	1 (1,2)	1 (0,9)
*DQA1*03:03*	10 (2,6)	2 (2,4)	2 (1,7)
*DQA1*04:01*	14 (3,7)	4 (4,8)	3 (2,6)
*DQA1*05:01*	42 (11,1)	14 (16,7)	14 (12,1)
*DQA1*05:05*	78 (20,5)	15 (17,9)	26 (22,4)

HLA - humani leukocitni antigeni, N- broj pojedinih alela, AIHA - bolesnici sa znakovima hemolize, AP - bolesnici i trudnice bez dokazane hemolize, AIHA *vs* kontrolna skupina χ^2=99,17; p=0,392, AP *vs* kontrolna skupina χ^2=104,83; p=0,252, AP *vs* AIHA χ^2=73,67; p=0,191.

Tablica 38. Učestalost alela lokusa HLA-DQB1 u skupini AIHA (N=84) i u skupini AP (N=116) u odnosu na učestalost istog alela kod ispitanika kontrolne skupine (N=380).

Aleli lokusa HLA-DQB1	**Kontrolna skupina N (%)**	**AIHA N (%)**	**AP N (%)**
*DQB1*02:01*	39 (10,3)	16 (19,0)	15 (12,9)
*DQB1*02:02*	20 (5,3)	4 (4,8)	8 (6,9)
*DQB1*03:01*	93 (24,4)	18 (21,4)	22 (19,0)
*DQB1*03:02*	23 (6,1)	4 (4,8)	8 (6,9)
DQB1*03:03	**5 (1,3)**	**5 (6,0)**	**7 (6,0)**
*DQB1*04:02*	12 (3,2)	4 (4,8)	4 (3,4)
*DQB1*05:01*	51 (13,4)	4 (4,8)	14 (12,1)
*DQB1*05:02*	42 (11,1)	8 (9,5)	11 (9,5)
*DQB1*05:03*	13 (3,4)	8 (9,5)	4 (3,4)
*DQB1*06:01*	3 (0,8)	1 (1,2)	2 (1,7)
*DQB1*06:02*	33 (8,7)	5 (6,0)	11 (9,5)
*DQB1*06:03*	26 (6,8)	4 (4,8)	6 (5,2)
*DQB1*06:04*	10 (2,6)	3 (3,6)	3 (2,6)

HLA - humani leukocitni antigeni, N- broj pojedinih alela, AIHA - bolesnici sa znakovima hemolize, AP - bolesnici i trudnice bez dokazane hemolize; AIHA *vs* kontrolna skupina χ^2=78,00; p=0,294, AP *vs* kontrolna skupina χ^2=117,00; p=0,261, AP *vs* AIHA χ^2=66,95; p=0,111.

Za ukupno 15 ispitanika s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG, 7 iz skupine AIHA i 8 iz skupine AP, koji su imali alel B*57, provedena je analiza alela ostalih HLA lokusa određivanih u ovom istraživanju te pretpostavljenih haplotipova u odnosu na jačinu direktnog antiglobulinskog testa (DAT), količine (titra) protutijela, vrijednosti hemoglobina i retikulocita (Slika 17.). 10 ispitanika (10% od ukupnog broja svih ispitanika s IgG autoprotutijelima) je imalo uz alel B*57 alele C*06 i DRB1*07 i jedan ili dva od 3 alela DQB1: DQB1*02:01 (DQ2), DQB1*02:02 (DQ2) i DQB1*03:03 (DQ9). Omjer DQ2:DQ9 je 5:7. Četiri od njih su imali visok titar antieritrocitnih IgG autoprotutijela (>100) i povišene apsolutne vrijednosti retikulocita. Troje ispitanika s visokim titrom IgG autoprotutijela i urednim apsolutnim brojem retikulocita imalo je alele B*57 i C*06, ali nisu imali alel DRB1*07.

Ispitanik (skupina)	A alel 1	A alel 2	B alel 1	B alel 2	C alel 1	C alel 2	DRB1-DQA1-DQB1 (1)	DRB1-DQA1-DQB1 (2)	DAT (score)	IgG1 (titar > od)	IgG3 (titar > od)	Hb g/L	Rtc x 10^9/L
1. (AP)	*02	*31	*44	*57	*06	*07	1301, 0103, 0603	1601, 0102, 0502	4	100	0	100	51,6
2. (AIHA)	*02	*29	*44	*57	*06	*16	0701, 0201, 0202	1601, 0102, 0502	4	10	0	80	110
3. (AIHA)	*02	*24	*08	*57	*06	*07	0301, 0501, 0201	0701, 0201, 0201	3	0	0	114	145
4. (AP)	*01	*26	*55	*57	*03	*06	1101, 0505, 0301	1454, 0104, 0501	2	100	0	146	50,3
5. (AP)	*01	*02	*08	*57	*07	*07	0101, 0105, 0501	0301, 0501, 0201	3	10	100	124	78,2
6. (AP)	*02	*26	*38	*57	*06	*12	0701, 0201, 0303	0301, 0501, 0201	4	10	0	97	61
7. (AP)	*23	*26	*44	*57	*04	*06	0701, 0201, 0303	0701, 0201, 0202	3	10	0	145	38,2
8. (AP)	*02	*02	*13	*57	*06	*06	0701, 0201, 0303	0701, 0201, 0202	2	0	0	139	52,3
9. (AP)	*01	*02	*35	*57	*04	*06	0901, 0302, **0303**	1104, 0505, 0301	3	10	0	166	43,4
10. (AP)	*01	*02	*52	*57	*06	*12	0701, 0201, 0303	1502, 0103, 0601	4	10	0	54	47,5
11. (AIHA)	*02	*02	*55	*57	*03	*06	0701, 0201, 0303	1454, 0104, 0503	4	100	100	76	297
12. (AIHA)	*02	*02	*52	*57	*06	*12	0701, 0201, 0303	1454, 0104, 0503	4	100	0	43	179
13. (AIHA)	*02	*03	*39	*57	*06	*12	0301, 0501, 0201	1601, 0102, 0502	3	10	0	75	110
14. (AIHA)	*02	*11	*52	*57	*07	*12	0701, 0201, 0303	0101, 0101, 0501	4	10	100	95	144
15. (AIHA)	*01	*26	*39	*57	*06	*06	0701, 0201, 0202	1113, 0104, 0503	3	100	0	62	162

Slika 17. Aleli HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1 i pretpostavljeni haplotipovi u ispitanika s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG, koji su imali alel B*57 [HLA - humani leukocitni antigeni, AIHA - bolesnici sa znakovima hemolize, AP - bolesnici bez dokazane hemolize, DAT - direktni antiglobulinski test, IgG1- imunoglobulin podrazreda IgG1, IgG3- imunoglobulin podrazreda IgG3, Hb - hemoglobin, Rtc - retikulociti, *- rastavnik, rozo - označeni aleli koji se naslijeđuju zajedno u istom haplotipu (B*57-C*06-DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*02:01/02:02; B*57-C*06-DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*03:03)]

Tri ispitanika (1,6% od ukupnog broja svih ispitanika kontrolne skupine) je uz alel B*57 imalo alele C*06 i DRB1*07 vezan s alelom DQB1*03:03 (DQ9) (Slika 18.).

Ispitanik (kontrolna skupina)	A alel 1	A alel 2	B alel 1	B alel 2	C alel 1	C alel 2	DRB1-DQA1-DQB1 (1)	DRB1-DQA1-DQB1 (2)
1.	*03	*32	*07	*57	*06	*07	0101, 0101, 0501	1454, 0104, 0503
2.	*02	*26	*27	*57	*02	*06	0701, 0201, 0303	1601, 0102, 0502
3.	*01	*03	*35	*57	*06	*06	1104, 0505, 0301	1401, 0104, 0501
4.	*02	*24	*18	*57	*06	*12	0701, 0201, 0303	1104, 0505, 0301
5.	*02	*31	*51	*57	*06	*14	1301, 0103, 0603	1601, 0102, 0502
6.	*01	*11	*35	*57	*06	*06	0701, 0201, 0303	0801, 0401, 0402

Slika 18. Aleli HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1 i pretpostavljeni haplotipovi u ispitanika kontrolne skupine, koji su imali alel B*57 [HLA - humani leukocitni antigeni, *-rastavnik, rozo- označeni aleli koji se naslijeđuju zajedno u istom haplotipu (B*57-C*06-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303)]

5. RASPRAVA

HLA sustav otkriven je nekoliko godina nakon otkrića većine eritrocitnih sustava krvnih grupa i nakon revolucionarnog otkrića antihumanog globulinskog (Coombsovog) testa. Funkcija molekula HLA vezana je za kristalnu strukturu HLA molekule i žlijeba unutar kojeg se vežu peptidi (Bjorkman i sur., 1987.).

HLA sustav je važan ne samo u transplantaciji i odabiru podudarnog solidnog organa, tkiva i krvotvornih matičnih stanica, nego je od znanstvenog i praktičnog interesa i ispitivanje povezanosti alela HLA s razvojem protutijela usmjerenih na lijek koji bolesnik prima kao terapiju osnovne bolesti kao i za odabir mogućeg alternativnog lijeka (Sazonovs i sur., 2020.). Pojedini aleli HLA važni su u dijagnostici brojnih autoimunih bolesti (šećerna bolest tipa 1 ovisna o inzulinu, Hashimotov tiroiditis, Gravesova bolest, miastenija gravis, multipla skleroza, sistemski eritemski lupus, reumatoidni artritis, ankilozantni spondilitis, celijakija) kao aleli koji se povezuju s povećanom sklonosti bolesti ili pak aleli koji se povezuju sa zaštitnim učinkom (Bodmer, 1980., Gough i Simmonds, 2007., Fernando i sur., 2008., Bettencourt i sur., 2015., Winchester i sur., 2019.).

Autoimuna hemolitička anemija za razliku od spomenutih autoimunih bolesti je rijetka bolest s incidencijom od 1 na 100 000 stanovnika (Gehrs i Friedberg, 2002.), a od svih oblika AIHA najčešća je topla AIHA (tAIHA) uzrokovana antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG. U odraslih bolesnika tAIHA je redovito ozbiljna i dugotrajna bolest, najčešće udružena s limfoproliferativnim bolestima (kroničnom limfocitnom leukemijom, non-Hodgkin limfomom), kroničnim upalnim/autoimunim bolestima i tumorima solidnih organa, a rjeđe infekcijama te lijekovima (Evans i Weiser, 1957., Dausset i sur., 1959., Bell i sur., 1973., Sokol i sur., 1981., Dacie, 1992., Gehrs i Friedberg, 2002., Lechner i sur., 2010., Kruhonja Galic i sur., 2020.). Manje od polovice slučajeva tAIHA javlja se bez poznatog uzroka (idiopatska AIHA), a simptomi tAIHA mogu mjesecima ili godinama prethoditi prepoznavanju neke druge bolesti. (Gehrs i Friedberg, 2002.).

Ranija istraživanja pokušala su utvrditi rizične alele sustava HLA za razvoj idiopatske AIHA (Da Costa i sur., 1974., Clauvel i sur., 1974., Abdel Khalik i sur., 1980.), a nekoliko starijih te novijih radova opisuje moguće protektivne alele lokusa HLA-DQ i HLA-DR (Wang-Rodriguez i Rearden, 1996., Nomura i sur., 1998., Lin i sur., 2017., Smirnova i sur., 2018.). Obzirom na nisku pojavnost bolesti, dosadašnja su istraživanja rađena na malim uzorcima bolesnika i do

danas nije utvrđena jasna povezanost alela sustava HLA sa sklonošću za razvoj antieritrocitnih autoprotutijela razreda IgG.

Osim u bolesnika s tAIHA, antieritrocitna autoprotutijela razreda IgG javljaju se i u osoba bez dokazane hemolize: u bolesnika s drugim oblicima anemija ili bez anemije, te kod trudnica i dobrovoljnih darivatelja krvi (zdravih osoba). Istraživanja pokazuju da su prirodna autoprotutijela razreda IgG široko rasprostranjena u ljudskom serumu i da je njihov broj podložan promjenama zbog dobi, spola i pridruženih bolesti (Nagele i sur., 2013.). Za razliku od prirodnih IgG autoprotutijela, još uvijek nije razjašnjeno zbog čega u određenih osoba dolazi do stvaranja protutijela na vlastite eritrocitne antigene i zbog čega navedena protutijela samo u nekih uzrokuju hemolitičku anemiju.

U nekoliko studija autori opisuju pojavu nastanka antieritrocitnih autoprotutijela nakon aloimunizacije na specifične eritrocitne antigene, nakon transfuzije, no uzrok moguće povezanosti nije jasan (Garratty, 2004., Young i sur., 2004.).

Polimorfizmi alela HLA prepoznati su u sklonosti pojedinih osoba za razvoj antieritrocitnih aloprotutijela i mogu imati prediktivnu vrijednost u odabiru fenotipiranog/genotipiranog krvnog pripravka s ciljem smanjenja aloimunizacija, osobito u bolesnika s visokom stopom aloimunizacija - mijelodisplastični sindrom, bolest srpastih stanica, talasemije (Körmöczi i Mayr, 2014.).

U ovoj doktorskoj disertaciji opisano je istraživanje u kojem su ispitani klasični geni sustava HLA razreda I (HLA-A, -B, -C) i geni sustava HLA razreda II (HLA-DRB1, -DQA1, - DQB1) u skupini od ukupno 100 bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG (AA). Učinjena je usporedba tih rezultata u odnosu na kontrolnu skupinu od 190 dobrovoljnih darivatelja krvi. Kontrolna skupina sastavljena je od dobrovoljnih darivatelja krvi, koji daju krv prema kriterijima Vijeća Europe (DIREKTIVA KOMISIJE 2004/33/EZ od 22. ožujka 2004. o provedbi Direktive 2002/98/EZ Europskog parlamenta i Vijeća u odnosu na određene tehničke zahtjeve za krv i krvne sastojke), a kod kojih nisu nađena antieritrocitna autoprotutijela.

Medijan za dob u skupini AA bio je 64 u odnosu na 41 u kontrolnoj skupini. Kontrolnu skupinu su činili dobrovoljni darivatelji krvi, u dobi od 19 do 62 godine. Skupinu AA činilo je 92 bolesnika u dobi od 19 do 94 godine starosti i 8 trudnica u dobi od 26 do 39 godina starosti. Medijan za dob u skupini bolesnika s hemolizom (AIHA) bio je 66, a u skupini bolesnika bez znakova hemolize (AP) 58. Pojavnost tAIHA raste iza 40 godine života s vršnom incidencijom

između 60 i 70 godina života (Pirofsky, 1968.), što smo i potvrdili našim rezultatima. U novijoj literaturi navedeni su i niži medijani za dob u bolesnika s AIHA: 58 u GIMEMA studiji (Barcellini i sur., 2014.), 31 (Das i sur., 2009.), 56 (Genty i sur., 2002.) i 53,5 (Wheeler i sur., 2004.). Navedene razlike u medijanima mogle bi biti odraz promatranih vrsta AIHA. Predmet interesa našeg istraživanja bili su bolesnici s toplim antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG, za razliku od navedenih studija koje su promatrale bolesnike s AIHA uzrokovanih autoprotutijelima različitih imunoglobulinskih razreda (IgM, IgG).

Omjer muškaraca i žena (M:Ž) u kontrolnoj skupini (3,6:1) bio je statistički značajno veći ($p<0,0001$) u odnosu na skupinu AA (1:1,6) koja je imala više žena, kao i pojedinačno u svakoj od skupina: AIHA (1:1,3) i AP (1:1,9). Između tih skupina nije bilo statistički značajne razlike u omjeru muškaraca i žena. Rezultati naše studije u skladu su s podacima iz literature koji navode veću učestalost žena u oboljelih od AIHA: 60% (Salama i sur., 2002.), 58% s idiopatskom AIHA i 66% sa sekundarnom AIHA (Dacie, 1992.), 56 žena u odnosu prema 27 muškaraca (Genty i sur., 2002.), omjer žena prema muškarcima 3,3:1 (Das, Nityanand, Chaudhary, 2009.), 64% žena prema 36% muškaraca (Barcellini i sur., 2014.), omjer žena prema muškarcima 1,9:1 (Kruhonja Galic i sur., 2020.).

U studijama povezanosti HLA s različitim bolestima utvrđene su razlike prema spolu (Schneider-Hohendorf i sur., 2018.). Za razumijevanje ovih razlika treba analizirati patofiziologiju autoimunih bolesti u muškaraca i žena obzirom na imuni odgovor. U muškaraca se autoimune bolesti klinički manifestiraju najčešće prije 50 godine i tada dominira akutna upala i Th-1 stanični odgovor. Kod žena u mlađoj životnoj dobi autoimune bolesti posredovane su autoprotutijelima, a starenjem raste količina autoprotutijela i pojačava Th-2 imuni odgovor. Navedena razlika prema spolu opisana je i u imunološkom odgovoru na infekciju ili traumu, i tada kod muškaraca nastaje pretežno Th-1 stanični upalni odgovor, a kod žena Th-2 imunološka reakcija posredovana autprotutijelima. Smatra se da upravo spolni hormoni uzrokuju usmjeravanje prema pojedinom tipu imunološkog odgovora (Fairweather i sur., 2008.).

Nakon prvog dijela našeg istraživanja, inicijalna skupina (AA) od 100 bolesnika i trudnica bila je podijeljena u 2 skupine: AIHA i AP. Podjela je učinjena na temelju kliničke slike i prisutnih, jednog ili više, laboratorijskih pokazatelja (povišene vrijednosti LDH i bilirubina, snižene vrijednosti hemoglobina i snižene vrijednosti retikulocita) koji bi upućivali na toplu autoimunu hemolitičku anemiju. Za bolesnike upućene iz klinika i bolnica, procjena kliničke slike i

biokemijski laboratorijski pokazatelji dobiveni su od kliničara koji je postavio sumnju na hemolitičku anemiju i zatražio potvrdu kliničke sumnje kroz dokazivanje antieritrocitnih autoprotutijela. Ti su ispitanici činili skupinu AIHA. Kod ostalih ispitanika antieritrocitna autoprotutijela bila su slučajan nalaz te su oni svrstani u skupinu AP. Antieritrocitna autoprotutijela razreda IgG ne uzrokuju uvijek hemolizu. Takva autoprotutijela nalaze se kod nekih bolesnika tijekom prijetransfuzijskog imunohematološkog ispitivanja (Worlledge, 1978.), u trudnica (Hoppe i sur., 2001., Surucu i sur., 2015.) i u skupini zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi (Gorst i sur., 1980.).

Za dodatnu provjeru aktivne hemolize kod svih 100 ispitanika (bolesnika i trudnica), određen je apsolutni broj retikulocita. Skupinu bolesnika sa znakovima hemolize (AIHA) činilo je 42 bolesnika, a vrijednosti retikulocita bile su povišene u 38 (90%) bolesnika, snižene u 2 (5%) bolesnika, te unutar normalnih vrijednosti u također 2 (5%) bolesnika. Drugu skupinu, bez dokazane hemolize (AP), činilo je 58 ispitanika (50 bolesnika i 8 trudnica), za koje su apsolutne vrijednosti retikulocita bile unutar intervala normalnih vrijednosti.

Osim primarne autoimune hemolitičke anemije (33%), najčešće **dijagnoze** u skupini AIHA bile su hematoonkološke (43%), pretežno limfoidne loze (Tablica 22.) i autoimune bolesti (14%). U skupini AP najčešće dijagnoze bile su hematoonkološke (19%), autoimune bolesti (16%), te solidni tumori (16%). Dobiveni podaci odgovaraju podacima opisanim u literaturi (Evans i sur., 1957, Dausset i sur., 1959., Bell i sur., 1973., Sokol i sur., 1981., Gehrs i sur., 2002., Lechner i sur., 2010., Kruhonja Galic i sur., 2020.).

Prema **spolu,** primarnu AIHA imalo je 3 (17%) muškaraca i 11 (46%) žena (p=0,057), što znači veću učestalost ženskog spola. Hematoonkološke bolesti imalo je 11 (61%) muškaraca i 7 (29%) žena (p=0,04), što predstavlja statistički značajno više muškaraca u odnosu na žene, a to se može objasniti većom učestalosti muškog spola (2:1) u kroničnoj limfatičnoj leukemiji koja predstavlja najčešću pojedinačnu hematoonkološku dijagnozu. Autoimune bolesti imalo je dvoje (11%) muškaraca i 4 (17%) žene (p=0,685), te nije bila nađena statistički značajna razlika.

U skupini AP nije bilo statistički značajne razlike prema spolu: hematoonkološke bolesti imalo je 6 (30%) muškaraca i 5 (13%) žena (p=0,119), autoimune bolesti 2 (10%) muškarca i 7 (18%) žena (p=0,476) i solidne tumore 3 (15%) muškarca i 6 (16%) žena (p=1,000).

U našem istraživanju bolesnici sa znakovima autoimune hemolitičke anemije imali su pretežno više vrijednosti (score) **DAT**-a u odnosu na bolesnike i trudnice bez hemolize (AP skupina). Statistički značajno više bolesnika u skupini AIHA je imalo DAT jačine 4+ u odnosu na bolesnike i trudnice u skupini AP (χ^2 za trend= 11,34; p=0,0008) (Tablica 20.).

Usporedili smo učestalost pojedinih **vrsta imunoglobulina**. U skupini bolesnika s AIHA, 59,5% je na eritrocitima imalo samo autoprotutijela razreda IgG, a 40,5% je uz IgG imalo i komponente komplementa C (IgG+C). U skupini bolesnika bez dokazane hemolize (AP), 74,1% bolesnika je imalo IgG, a 25,9% uz IgG i komponente komplementa C. U našoj studiji, između skupina AIHA i AP nije nađena statistički značajna razlika u usporedi pojavnosti antieritrocitnih autoprotutijela razreda IgG samih za sebe ili kada su se uz njih pojavile i komponente komplementa C (p=0,124). U literaturi postoje brojni podaci o raspodjeli antieritrocitnih protutijela razreda IgG, samih ili istovremeno s komponentama komplementa C u bolesnika s AIHA. Rezultati našeg istraživanja usporedivi su s rezultatima starijih radova koji navode učestalost samog IgG 20-66%, IgG + C u 24-63% i samog komplementa 7-14% u bolesnika s AIHA (Salama i sur., 2002., Sokol i sur., 1981., Petz i sur., 1980., Chaplin, 1973.) te podataka dobivenih u GIMEMA studiji za 183 bolesnika s toplom AIHA sa 72% IgG i 28% IgG+C (p=0,1128) (Barcellini i sur., 2014.) i u studiji na 43 bolesnika s AIHA od kojih je 72,1% bolesnika imalo samo IgG autoprotutijela (p=0,2272) (Das i sur., 2009.). Podaci koje smo dobili u našem istraživanju razlikuju se u odnosu na studiju u kojoj je 72% bolesnika imalo pozitivan DAT zbog IgG+C od ukupno 29 bolesnika s AIHA (p=0,0094) (Wheeler i sur., 2004.), a razlog bi mogao biti taj što je 93% bolesnika imalo sekundarnu AIHA.

U istraživanju smo usporedili učestalost i raspodjelu antieritrocitnih autoprotutijela prema **podrazredima IgG1 i IgG3** u skupinama AIHA i AP. Dobivena je statistički značajno veća učestalost bolesnika koji su imali antieritrocitna autoprotutijela podrazreda IgG1 u skupini AIHA 83,3% u odnosu na 56,9% u bolesnika skupine AP (p=0,006). To je sukladno podacima iz literature (Garraty, 1989., Engelfriet i sur., 1992., Gehrs i Friedberg., 2002., Lai i sur., 2013.). Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti samostalnog pojavljivanja antieritrocitnih autoprotutijela podrazreda IgG1 ili IgG3. Autoprotutijela razreda IgG kojima nismo dokazali podrazred bila su statistički značajno češća u skupini AP (p=0,01, Tablica 21.). To može značiti

da su autoprotutijela bila u niskom titru ili se radilo o autoprotutijelima podrazreda IgG2 koja izuzetno rijetko uzrokuju hemolizu ili podrazreda IgG4 koja ne uzrokuju hemolizu.

Prvo su analizirani rezultati pojedinih alela HLA razreda I i II u skupini bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG (AA, n=100), te u kontrolnoj skupini dobrovoljnih darivatelja krvi (kontrolna skupina, n=190), a potom i pretpostavljeni haplotipovi.

Najčešće zastupljeni aleli lokusa HLA-A u skupini AA su bili HLA-A*02 (36,0%), HLA-A*01 (14,5%), HLA-A*03 (14,0%) i HLA-A*24 (9,0%). U kontrolnoj skupini najčešći alel lokusa HLA-A bio je HLA-A*02 (29,7%), a slijedili su HLA-A*03 (16,6%), HLA-A*24 (11,3%) i HLA-A*01 (10,3%). Na lokusu HLA-A je učinjena usporedba vrijednosti χ^2 testom za neovisne uzorke i nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih alela između skupine AA i kontrolne skupine (χ^2=113,56; p=0,167). U skupini AA u usporedbi s kontrolnom skupinom uočena je češća zastupljenost alela HLA-A*02 (36,0% u AA skupini prema 29,7% u kontrolnoj skupini, p=0,122). Obje promatrane skupine potpuno su usporedive s rezultatima istraživanja za populaciju hrvatskih dobrovoljnih darivatelja koštane srži (Grubić i sur., 2014.) i skupinu Amerikanaca istočno-europskog podrijetla (Mack i sur., 2009.) te nisu uočene statistički značajne razlike u učestalosti pojednih alela lokusa HLA-A.
U istraživanju Da Coste i sur. iz 1974. na 56 bolesnika, od kojih 12 s idiopatskom AIHA, 29 s limfomima, 10 pod terapijom lijekom α-metildopa i 5 s pozitivnim DAT-om opisano je značajno povećanje u izražaju antigena HLA-A1 i HLA-A8 (Da Costa i sur., 1974.). Iste godine su Clauvel i sur. objavili potpuno drugačije rezultate i to za skupinu od 31 bolesnika s primarnom AIHA (Clauvel i sur., 1974.). Oni su pronašli povećane razine antigena HLA-A3, a normalnu učestalost antigena HLA-A1, HLA-A7 i HLA-A8. Dausset i Hors su 1975. u skupini od 36 bolesnika s idiopatskom AIHA (11 muškaraca i 25 žena) objavili veću učestalost antigena HLA-A3, bez razlika u učestalosti ostalih antigena HLA-A u odnosu na kontrolnu skupinu (Dausset i Hors, 1975.). Abdel-Khalik i sur. 1980. na 20 bolesnika s idiopatskom AIHA-a nisu uočili veću učestalost antigena HLA-A1 niti HLA-A3 (Abdel-Khalik i sur., 1980.).
U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o istraživanju alela lokusa HLA-A i pojave antieritrocitnih autoprotutijela ili AIHA.

Najčešće zastupljeni aleli lokusa HLA-B u skupini AA su bili HLA-B*35 (14,5%), HLA-B*08 (10,0%) i HLA-B*51 (9,5%), a u kontrolnoj skupini HLA-B*51 (12,9%), HLA-B*35 (10,8%), HLA-B*07 (9,7%) i HLA-B*18 (9,5%). Na lokusu HLA-B je učinjena usporedba vrijednosti

χ^2 testom za neovisne uzorke i nije uočena statistički značajna razlika između pojedinih alela AA skupine i kontrolne skupine (χ^2=228,56; p=0,181). U skupini AA u usporedbi s kontrolnom skupinom značajno su češće zastupljeni aleli HLA-B*08 (10,0% u AA u odnosu na 5,5% u kontrolnoj skupini, p=0,044 OR 1,90, 95% CI 1,00-3,60) i HLA-B*57 (7,5% u AA skupini prema 1,6% u kontrolnoj skupini, **p=0,0003**, OR 5,05, 95% CI 1,93 - 13,24). Nakon korekcije samo alel HLA-B*57 je ostao i dalje statistički značajno češći u skupini AA (**p_k=0,008**). S obzirom na dobivenu veću učestalost alela B*57 na lokusu HLA-B u skupini AA, naknadno je uspoređena učestalost alela HLA-B*57 između skupina AIHA, AP i kontrolne skupine te je nađena statistički značajno veća učestalost u skupini AIHA (**p=0,0001**, OR 14,7, 95% CI 4,81 - 44,74) i AP (p=0,010, OR 4,00, 95% CI 1,32 - 12,16) u odnosu na kontrolnu skupinu. Nakon korekcije u skupini AIHA i dalje je vidljiva statistički značajna razlika (**p_k=0,005**). Usporedba s rezultatima serološkog testiranja hrvatske populacije (Grubić i sur., 2014.) nije pokazala značajne razlike u odnosu na našu kontrolnu skupinu. Uočena je razlika u učestalosti alela B*51, koji je u statistički značajno većoj frekvenciji bio prisutan u našoj kontrolnoj skupini (p<0,0001) u odnosu na skupinu Amerikanaca istočno-europskog podrijetla (Mack i sur., 2009.). Ova razlika pokazuje važnost odabira kontrolne skupine te potvrđuje veću učestalost alela B*51 u jugoistočnoj Europi (Sanchez-Mazas i sur., 2013.). U literaturi su redom dostupna serološka istraživanja. Abdel-Khalik i sur. 1980. su na 20 bolesnika s idiopatskom AIHA-a uočili veću učestalost antigena HLA-B8 i HLA-BW6 (Abdel- Khalik i sur., 1980.). Toolis i sur. su 1977. opisali prisutnost antigena HLA-B7 i HLA-B8 te HLA-A1 u dvije sestre (od petero djece) koje su razvile AIHA (Toolis i sur., 1977.). Opisana je prisutnost HLA-B27 antigena u slučaju djeteta s hepatitisom koje je razvilo AIHA (Čulić i sur., 1999.) te povezanost AIHA-e i idiopatske plućne fibroze s antigenom HLA-B27 (Lortholary i sur., 1990.). Osim seroloških istraživanja u literaturi ne postoje istraživanja o mogućoj povezanosti razvoja antieritrocitnih autoprotutijela i/ili AIHA s nekim od alela HLA.

Najčešće zastupljeni aleli lokusa HLA-C u skupini AA bili su HLA-C*07 (30,0%), HLA-C*04 (17,5%), HLA-C*06 (12,5%) i HLA-C*12 (11,5%), a u kontrolnoj skupini HLA-C*07 (26,6%), HLA-C*12 (17,9) i HLA-C*04 (11,1%). Na lokusu HLA-C je učinjena usporedba vrijednosti χ^2 testom za neovisne uzorke i nije uočena statistički značajna razlika između pojedinih alela AA skupine i kontrolne skupine (χ^2=88,00; p=0,279). U skupini AA nađena je statistički značajno veća učestalost alela HLA-C*04 (17,5% u skupini AA u odnosu na 11,1%

u kontrolnoj skupini) (p=0,031, OR 1,71, 95% CI 1,05-2,77) i HLA-C*06 (12,5% u skupini AA u odnosu na 6,8% u kontrolnoj skupini) (p=0,021; OR 1,95,; 95% CI 1,09 - 3,47). Za alel HLA-C*12 nađena je značajno manja učestalost u skupini AA (11,5% u skupini AA u odnosu na 17,9% u kontrolnoj skupini) (p=0,044; OR 0,60; 95% CI 0,36-0,99). Nakon korekcije navedene razlike više nisu bile statistički značajne, a korigirane p vrijednosti bile su p_k=0,357 za HLA-C*04 , p_k=0,257 za HLA-C*06 i p_k=1,000 za HLA-C*12 (Tablica 25.). Uočena je statistički značajno veća učestalost (p<0,0001) alela C*12 u našoj kontrolnoj skupini (17,9%) od 380 alela u odnosu na kontrolnu skupinu Amerikanaca istočno-europskog podrijetla (7,8%) od 1116 alela (Tablica 3.). U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o istraživanju alela lokusa HLA-C i pojave antieritrocitnih autoprotutijela ili AIHA.

Usporedbom frekvencija alela lokusa DRB1 nije nađena statistički značajna razlika (χ^2= 110,50; p= 0,222) između skupine AA i kontrolne skupine. Uočena je veća učestalost alela DRB1*03 i DRB1*11 u skupini AA u odnosu na kontrolnu skupinu, ali nije bila statistički značajna (p=0,165 za DRB1*03) i (p=0,507 za DRB1*11). Veća učestalost alela DRB1*01 opažena u kontrolnoj skupini (11,6%) u odnosu na 6,5% u skupini AA, bila je na granici statističke značajnosti (p=0,050), ali se ta značajnost izgubila nakon korekcije (p_k=0,487). U skupini AA nađena je statistički značajno veća učestalost alela DRB1*07:01 (12,0% u skupini AA u odnosu na 6,3% u kontrolnoj skupini) (p=0,018, OR 2,02, 95% CI 1,12-3,66), no ne i nakon korekcije (p_k=0,210). Veća učestalost alela DRB1*07:01 u AIHA skupini (13,1%) u odnosu na kontrolnu skupinu (6,3%) bila je također statistički značajna samo do korekcije (p=0,033, p_k=0,922). Naša kontrolna skupina usporediva je s hrvatskom populacijom (Grubić i sur., 2000.) i nema statistički značajne razlike između ovih dviju skupina. Alel DRB1*16:01 je statistički značajno rjeđi u skupini Amerikanaca istočno-europskog podrijetla (p<0,0001) u odnosu na kontrolnu skupinu i hrvatsku populaciju, dok je alel DRB1*07:01 statistički značajno rjeđi u kontrolnoj skupini u odnosu na skupinu Amerikanaca istočno-europskog podrijetla (p=0,001, p_k=0,035).

Na lokusu HLA-DQA1 nije uočena statistički značajna razlika, na razini niske rezolucije, između skupine AA i kontrolne skupine (χ^2= 30,00; p= 0,224). U skupini AA u usporedbi s kontrolnom skupinom statistički je značajno češće zastupljen alel DQA1*02 (12% u AA

skupini prema 6,3% u kontrolnoj skupini) (p=0,018, OR 2,02, 95% CI 1,11-3,66), ali nakon korekcije češća zastupljenost više nije bila statistički značajna (p_k=0,103). U visokoj rezoluciji nisu uočeni aleli s razlikom većom od 5% osim za alel DQA1*02:01 koji je jedini alel u alelnoj skupini DQA1*02 (niska rezolucija). I u skupini AIHA nađena je statistički značajno veća učestalost alela HLA-DQA1*02:01 (13,1%), u odnosu na kontrolnu skupinu (6,3%), ali korekcijom p vrijednosti izgubila se statistička značajnost (p=0,033, p_k=0,658). Usporedbom alela lokusa DQA1 kontrolne skupine i hrvatske populacije (Grubić i sur., 2000.) nisu uočene statistički značajne razlike. Alel DQA1*05:01 naveden za hrvatsku populaciju (Tablica 5.) obuhvaća alele DQA1*05:01 i DQA1*05:05 pa ne postoji značajna razlika u učestalosti između promatranih skupina. Zbroj frekvencija alela DQA1*03:01, *03:02 i *03:03 kontrolne skupine usporediv je s podacima za hrvatsku populaciju, za ukupan broj alela DQA1*03.

Usporedbom kontrolne skupine i skupine AA, na razini niske rezolucije nisu nađene statistički značajne razlike u učestalosti alela DQB1 (χ^2= 20,00; p= 0,220), kao ni na razini visoke rezolucije (χ^2= 143,00; p= 0,242), gdje je uspoređeno 17 alela. U skupini AA u usporedbi s kontrolnom skupinom najveća je razlika u učestalosti uočena za alel DQB1*02 (21,5% u AA skupini prema 15,5% u kontrolnoj skupini), ali nije bila statistički značajna (p=0,071). Najčešći aleli lokusa HLA-DQB1 u skupini AA su bili DQB1*03:01 (21,5%), DQB1*02:01 (15,0%), a u kontrolnoj skupini DQB1*03:01 (24,4%) i DQB1*05:01 (13,4%). U skupini AA uočena je veća učestalost alela DQB1*02:01 (15,5% u skupini AA u odnosu na 10,3% u kontrolnoj skupini), ali bez statističke značajnosti (p=0,097) i značajno veća učestalost alela DQB1*03:03 (6,5% u skupini AA u odnosu na 1,3% u kontrolnoj skupini) (**p=0,001**, **p_k=0,017**, OR **5,21**, 95% CI 1,83 - 14,84) (Tablica 31.), koja je i nakon korekcije statistički značajna. Na lokusu DQB1 nađeno je nekoliko alela čije su frekvencije između skupine AIHA i kontrolne skupine pokazale značajne razlike do korekcije p vrijednosti (Tablica 38.). Veća učestalost alela DQB1*03:03 u skupini AIHA (p=0,007) i u skupini AP (p=0,004) u odnosu na kontrolnu skupinu nakon korekcije više nije bila statistički značajna (p_k=0,213 za AIHA skupinu i p_k=0,127 za AP skupinu). U usporedbi naše kontrolne skupine s podacima za hrvatsku populaciju (Grubić i sur., 2000.) nije uočena značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu.

Zbog neravnoteže vezanja alela učinjena je analiza pretpostavljenih haplotipova. Usporedbom haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 između skupine AA i kontrolne skupine nisu uočene

statistički značajne razlike (χ^2=168,28; p=0,204). Posebno su analizirani aleli DRB1*07:01 i DQB1*03:03 za koje je uočeno češće pojavljivanje u AA skupini te njihovo pojavljivanje u haplotipskoj svezi. U AA skupini je uočena haplotipska sveza DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*03:03 (6,0%), dok se u kontrolnoj skupini, pojavila haplotipska sveza DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*02:02 (5,0%). Navedene skupine razlikovale su se u alelu DQB1*03:03, koji je pokazao značajno češću pojavnost u AA skupini u odnosu na kontrolnu skupinu. U skupini AA dobivena je statistički značajno veća učestalost haplotipske sveze DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*03:03 (p=0,001; OR 6,00, 95%CI (1,91 - 18,86), ali se nakon korekcije u odnosu na ukupan broj različitih haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 (n=79) statistička značajnost postala samo indikativna (p_k=0,076).

Najčešće haplotipske sveze nađene u kontrolnoj skupini usporedive su s podacima za opću hrvatsku populaciju i djelomično za skupinu Amerikanaca europskog podrijetla. U našoj kontrolnoj skupini (i općoj hrvatskoj populaciji) opažena je veća učestalost haplotipa DRB1*16:01-DQA1*01:02-DQB1*05:02 u odnosu na učestalost tog haplotipa u populaciji Amerikanaca europskog podrijetla (p<0,0001).

Aleli HLA-Cw*6, HLA-B*57, DRB1*0701/02, DQA1*02:01 i DQB1*03:03 su rizični aleli za psorijazu tipa 1 (teži oblik s relapsima) (Muto i sur., 1995.). Među hrvatskim bolesnicima s psorijazom najjaču povezanost su imali aleli HLA-B*39 i HLA-B*57 (Grubić, 2004). U Hrvatskoj je konzervirani haplotip psorijatičara bijele rase DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:01 bio češće zastupljen nego haplotip DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*03:03, koji je češći u Njemačkoj (Schmitt-Egenolf i sur., 1993., Kaštelan i sur., 2015.). Ispitanici skupine AA s gore spomenutim haplotipovima, obrađeni u ovoj disertaciji, nisu u anamnezi imali psorijazu.

Najčešće bolesti udružene s AIHA su limfoproliferativne, a najjaču povezanost ima kronična limfatična leukemija (KLL): 5-10% bolesnika s KLL imat će tAIHA (De Loughery, 2013.). GWAS su posljednjih godina pokazale da je područje 6p21.3 od posebnog interesa za razvoj KLL. Stanje asimptomatske limfocitoze smatra se pokazateljem mogućeg razvoja KLL, ali do sada nije nađena jasna povezanost alela HLA niti s tim stanjem niti s KLL. Prisutnost alela DQB1*03 u osoba s asimptomatskom limfocitozom kod kojih postoji mutacija teškog lanca imunoglobulina pokazuje trend povećanog rizika za progresiju u KLL. Alel DQB1*02 povezuje se s manjim zahtjevima za liječenjem, no niti ovaj rad nije dosegao statističku značajnost (Garcia-Alvarez i sur., 2017.). Također, autori nisu pronašli nikakvu razliku u frekvencijama

alela između liječenih i neliječenih bolesnika u odnosu na prijašnje radove koji su našli haplotip A*01:01-C*07:01-B*08:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 koji bi imao protektivni učinak u bolesnika s KLL (Gragert i sur., 2014.).

Ako pogledamo sklonost ka razvoju aloprotutijela, Nizozemci su našli veću učestalost alela DRB1*07 u bolesnika koji su stvorili aloprotutijela na eritrocitni antigen S (Schoenwille i sur., 2014.), a kineski autori su uočili da je alel DRB1*07:01 povezan sa stvaranjem aloprotutijela na eritrocitni antigen RhD. U radu Ahrensa i suradnika objavljenom 2008. uočena je povezanost razvoja aloprotutijela usmjerenih na S i s antigene te protutijela usmjerenih na RHCE protein u osoba koje su razvile antieritrocitna autoprotutijela (Ahrens i sur., 2008.). Oni se nisu bavili povezanošću razvoja aloprotutijela niti autoprotutijela sa sustavom HLA, ali su kao moguće objašnjenje uočene autoimunizacije uz aloimunizaciju naveli širenje epitopa (engl. *epitope spreading*). Antigeni S i s smješteni su na eritrocitnoj membrani na glikoforinu B blizu Rh proteina, koji su direktno povezani s Band 3 proteinom, s kojim čine makromolekularni kompleks. Pretpostavljaju da je nakon početnog poticaja antigena na razvoj aloprotutijela, došlo do širenja imunološkog odgovora na susjedne strukture, često kriptoantigene, koji se razlikuju od antigena koji su potaknuli početni imunološki odgovor i koji inače ne bi bili dostupni imunološkom sustavu organizma. Kao drugo moguće objašnjenje navode kako je S fenotip povezan s imunoregulatornim genima koji mogu pridonijeti autoimunizaciji.

Druge studije navode alele DQB1*02 (Raos i sur., 2019., Tatari-Calderone i sur., 2016.) i DQB1*03 i DQB1*05 (Tatari-Calderone i sur., 2016.) kao moguću zaštitu od razvoja aloprotutijela na eritrocitne antigene.

Rezultati opisani u ovoj disertaciji nisu potvrdili istraživanja iz Kalifornije, na malom uzorku DAT pozitivnih zdravih davatelja (N=8) i DAT pozitivnih bolesnika (N=23, od kojih 22 s kliničkom hemolizom), koje je pokazalo smanjenu učestalost HLA-DQ6 u DAT pozitivnih ispitanika u odnosu na 85 ispitanika kontrolne skupine (Wang Rodriguez i sur., 1996.), kao ni Japanskih autora koji su potvrdili smanjenu učestalost alela DQB1*0602 u skupini pacijenata s različitim autoimunim bolestima (sistemskim eritemskim lupusom, Bechetovom bolesti, idiopatskom trombocitpeničnom purpurom i drugim) u odnosu na kontrolnu skupinu (Nomura i sur., 1998.). U rezultatima dobivenim u ovom doktorskom radu, jednako kao i u istraživanju iz Kalifornije, nije uočena statistički značajna razlika u alelima lokusa DRB1 između kontrolne skupine i ispitanika s pozitivnim DAT-om (Wang Rodriguez i sur., 1996.). Kineski autori nisu pronašli statistički značajnu povezanost DAT (IgG)-pozitivnih pacijenata s HLA-DRB1 i HLA-

DQB1 alelima, iako su, kao što je uočeno i u ovoj disertaciji, uočili veću učestalost alela DRB1*07:01 u DAT (IgG)-pozitivnih pacijenata. U podskupini pacijenata s C3d pozitivnim DAT-om uočili su veću učestalost alela HLA-DRB1*14 i nisu našli niti jednog pacijenta s alelom HLA-DRB1*13 (Lin i sur., 2017.). U istraživanju kineskih autora pacijenti su odabrani nakon što su poslije primljene transfuzije imali pozitivan IAT sa svim testnim eritrocitima i pozitivan DAT. Također, njihova je kontrolna skupina bila prevelika u odnosu na broj DAT - pozitivnih pacijenata (1,6 milijuna zdravih davatelja koštane srži prema 117 pacijenata). Slično kao i u AA skupini, u Ruskoj populaciji pacijenata s AIHA je nađena veća učestalost alela HLA-DRB1*03, dok je HLA-DRB1*15 bio češći i u našoj kontrolnoj skupini (Smirnova i sur., 2018.). Oni su našli i veću učestalost alela HLA-DRB1*16 u AIHA skupini, dok u ovom istraživanju nisu uočene razlike u učestalosti tog alela između AA skupine i kontrolne skupine. Alel HLA-DRB1*11 je bio češći u kontrolnoj skupini istraživanja ruskih autora, kao i u AA skupini u ovom radu, ali bez statističke značajnosti. U istraživanju ruskih autora nije dosegnuta statistička značajnost uočenih razlika u učestalosti pojedinih alela HLA.

Ograničenost u istraživanju povezanosti alela HLA s nastankom AIHA vidljiva je i u sličnim istraživanjima limfoproliferativnih bolesti. Osim dobro odabrane skupine bolesnika važno je odabrati i reprezentativnu kontrolnu skupinu. Snaga testa raste s brojem ispitivanih uzoraka, a za bolesti koje se javljaju u kasnijoj životnoj dobi ili koje su rijetke vrlo je teško skupiti dovoljan broj uzoraka. Neravnoteža vezanja pojedinih alela u haplotipove znači da utjecaj pojedinog alela može izgubiti na važnosti, jer je taj alel vezan zajedno s alelima drugih lokusa. Brojni citokini mijenjaju smjer imunološkog odgovora i djeluju kao dodatni čimbenici u imunološkoj reakciji. Geni za citokine i medijatore imunološke reakcije smješteni su u području između lokusa HLA razreda I i lokusa HLA razreda II i naslijeđuju se, iako ih ne smatramo genima HLA sustava. Za multifaktorijalnu bolest, kakva je AIHA, a i ostale citopenije, smatramo kako bi istraživanja trebalo proširiti na gene koji sudjeluju u izgradnji i pregradnji imunoglobulinskih lanaca autoprotutijela te polimorfizme i mutacije gena koji uzrokuju različit oblike smanjene ili nedostatne imunosti.

Dosadašnja serološka istraživanja sustava HLA, bavila su se ispitivanjem tek pojedinih lokusa HLA. Također, skupine DAT pozitivnih ispitanika bile su male: 56 bolesnika (Da Costa i sur., 1974.), 31 bolesnik (Clauvel i sur., 1974.), 36 bolesnika (Dausset i Hors, 1975.), 20 bolesnika (Abdel-Khalik i sur., 1980.), kao i njihove kontrolne skupine. Objavljivani su radovi iz

obiteljskih studija (Pirofsky, 1968., Toolis i sur., 1977.), kao i pojedinačni slučajevi (Čulić i sur., 1999.).

U molekularnim istraživanjima provedenim u posljednjih dvadesetak godina, ispitivani su aleli lokusa DRB1 i DQB1, ali ne i aleli lokusa HLA-A, -B i -C, tako da u dostupnoj literaturi ne postoje podaci o mogućoj povezanosti alela tih lokusa i pojave antieritrocitnih autoprotutijela i/ili AIHA. No, i u većini tih istraživanja ispitivan je malen broj ispitanika s pozitivnim DAT-om: 8 darivatelja krvi i 23 bolesnika (22 s hemolizom) i 85 kadaveričnih uzoraka kontrolne skupine (Wang Rodriguez i sur., 1996.), 5 bolesnika s pozitivnim DAT-om u skupini od ukupno 140 bolesnika s autoimunim bolestima i 50 ispitanika kontrolne skupine (Nomura i sur., 1998.), 24 bolesnika s AIHA-om i 1507 ispitanika kontrolne skupine zdravih davatelja (Smirnova i sur., 2018.).
Jedino istraživanje objavljeno na većem broju ispitanika bilo je istraživanje lokusa DRB1 i DQB1 na 117 bolesnika koji su panreaktivna antieritrocitna protutijela razvili nakon transfuzije krvi, bez podataka o njihovim dijagnozama, a uspoređeni su s podacima za 1,6 milijuna zdravih davatelja koštane srži, što prikazuje nesrazmjerno veliku kontrolnu skupinu u odnosu na promatranu skupinu (Lin i sur., 2017.).

Istraživanje opisano u ovoj disertaciji je po prvi puta uključilo molekularno ispitivanje velikog broja lokusa i alela sustava HLA, koji su najpolimorfniji geni u čovjeka. Ispitivanje je rađeno u osoba s dokazanim antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG na uzorku od 100 ispitanika (AA), od čega 42 bolesnika s kliničkom hemolizom te 50 bolesnika i 8 trudnica bez znakova kliničke hemolize. Po prvi puta je ispitana učestalost alela HLA razreda I: HLA-A, HLA-B, HLA-C. Usporedba najčešćih alela lokusa HLA-A i najčešćih haplotipova HLA-DRB1-DQA1-DQB1 skupine AA i kontrolne skupine s literaturnim podacima za hrvatsku populaciju (Tablica 1., Tablica 7.) pokazuje kako između njih nema značajnih razlika te kako su i ispitivana skupina (AA) i kontrolna skupina genetički vrlo homogene skupine. Usporedbom hrvatske populacije s populacijom Amerikanaca europskog podrijetla može se uočiti razlika, npr. veća učestalost haplotipa DRB1*16:01-DQA1*01:02-DQB1*05:02 u hrvatskoj populaciji, koji je jedinstven za hrvatsku populaciju. Upravo je genska homogenost omogućila istraživanje povezanosti lokusa HLA u osoba s prisutnim antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG sa i bez dokazane kliničke AIHA te je dobivena statistički značajno češća zastupljenost alela HLA-B*57 i alela DQB1*03:03 u odnosu na 190 zdravih ispitanika kontrolne skupine. Podjela

skupine AA na skupine AIHA i AP s relativno malim brojem ispitanika, u kombinaciji s vrlo velikim faktorom korekcije, mogla je dovesti do pogreške u interpretaciji dobivenih rezultata. Obzirom na uočene široke intervale pouzdanosti, smatramo kako bi bilo poželjno nastaviti promatranje ovako velikog broja lokusa na još većem broju DAT-pozitivnih bolesnika, sa i bez kliničke hemolize radi povećanja snage testa. Poželjno bi bilo proširiti ispitivanja i na zdrave DAT-pozitivne dobrovoljne darivatelje krvi jer bi to moglo doprinijeti otkrivanju protektivnog alela i boljem razumijevanju uloge alela HLA.

6. ZAKLJUČCI

1. Karakteristike ispitivane skupine bile su:
    I. Najčešće dijagnoze bile su hematoonkološke, autoimune bolesti i solidni tumori; osim primarne autoimune hemolitičke anemije (33%), najčešće dijagnoze u skupini bolesnika s dokazanom hemolizom (AIHA) bile su hematoonkološke (43%), pretežno limfoidne loze, dok su u skupini ispitanika bez dokazane hemolize (AP) najčešće dijagnoze bile hematoonkološke (19%), autoimune bolesti (16%) i solidni tumori (16%).
    II. Bolesnici s AIHA imali su pretežno više vrijednosti (score) DAT-a u odnosu na bolesnike i trudnice bez hemolize.
    III. Bolesnici s AIHA su imali statistički značajno češće antieritrocitna autoprotutijela podrazreda IgG1, a ispitanici AP skupine autoprotutijela razreda IgG, kojima nije dokazan podrazred.
2. Geni HLA razreda I:
    I. Na lokusu HLA-A nije uočena statistički značajna razlika između pojedinih alela skupine bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG (AA) skupine i kontrolne skupine zdravih ispitanika.
    II. U skupini AA u usporedbi s kontrolnom skupinom značajno su češće zastupljeni aleli HLA-B*08 i HLA-B*57. Nakon korekcije samo alel HLA-B*57 je i dalje bio statistički značajno češći u skupini AA.
    III. Na lokusu HLA-C nije uočena statistički značajna razlika između pojedinih alela AA skupine i kontrolne skupine. Najčešće zastupljeni aleli lokusa HLA-C u skupini ispitanika s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG bili su HLA-C*07 (30,0%), HLA-C*04 (17,5%), HLA-C*06 (12,5%) i HLA-C*12 (11,5%), a u kontrolnoj skupini HLA-C*07 (26,6%), HLA-C*12 (17,9) i HLA-C*04 (11,1%).
3. Geni HLA razreda II:
    I. U skupini AA nađena je veća učestalost alela DRB1*03:01, DRB1*07:01 i DRB1*11:04, kao i manja učestalost alela DRB1*01:01 i alela DRB1*13:01 u odnosu na kontrolnu skupinu, ali nakon korekcije nije bilo statističke značajnosti.

II. U skupini AA nađena je manja učestalost alela DQA1*01:01 i veća učestalost alela DQA1*02:01 u odnosu na kontrolnu skupinu, ali nakon korekcije više nije bilo statističke značajnosti.

III. U skupini AA uočena je veća učestalost alela DQB1*02:01 i DQB1*03:03 te manja učestalost alela DQB1*03:01 i DQB1*05:01 u odnosu na kontrolnu skupinu. Nakon korekcije jedino alel DQB1*03:03 je ostao i dalje statistički značajno češće zastupljen u skupini AA.

4. Haplotipovi:

   I. Aleli HLA-B*57, DRB1*07:01, DQA1*02:01 i DQB1*03:03 su bili u neravnoteži udruživanja te su se pojavili u istom haplotipu.

   II. U skupini AA češće se pojavio haplotip B*57-DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*03:03, ali ne na razini statističke značajnosti.

5. Podjela skupine AA na manje skupine AIHA i AP:

   I. Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti alela lokusa HLA-A i-C.

   II. Veća učestalost alela DRB1*07:01, DQA1*02:01 i DQB1*03:03 u AIHA skupini bila je statistički značajna samo do korekcije.

   III. Veća učestalost alela B*57 ostala je statistički značajna i nakon korekcije samo u skupini AIHA, ali ne i u skupini AP.

6. U ovoj doktorskoj disertaciji utvrđeno je:

   I. Statistički značajno veća učestalost alela HLA-B*57 i alela DQB1*03:03 u ispitanika s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG u odnosu na ispitanike kontrolne skupine te alela HLA-B*57 u ispitanika s AIHA.

   II. Potvrđena je pretpostavka o mogućoj povezanosti gena sustava HLA sa stvaranjem autoimunog odgovora na eritrocitne antigene.

   III. Navedeni aleli bi mogli služiti kao potencijalni genetički biljezi u osoba s laboratorijskim znacima AIHA.

   IV. Nije uočena statistički značajno manja učestalost niti jednog alela u promatranoj skupini bolesnika i trudnica s antieritrocitnim autoprotutijelima razreda IgG (AA) u odnosu na kontrolnu skupinu te nije utvrđen protektivni alel.

7. POPIS LITERATURE

Abbas AK, Licthman AH, Pillai S (2018) Stanična i molekularna imunologija. 8. izd. Medicinska naklada, Zagreb.

Abdel-Khalik A, Paton L, White AG, Urbaniak SJ (1980) Human leukocyte antigens A, B, C and DRW in idiopathic „warm“ autoimmune hemolytic anaemia. Br Med J 280: 760-761.

Ahmad E, Elgohary T, Ibrahim H (2011) Naturally occurring regulatory T cells and interleukins 10 and 12 in the pathogenesis of idiopathic warm autoimmune hemolytic anemia. J Investig Allergol Clin Immunol 21: 297–304.

Ahmadi K, Wilson C, Tiwana H, Ebringer A, Shanmuganathan S, Binder A (1998) Antibodies to Klebsiella pneumoniae nitrogenase reductase in patients with ankylosing spondylitis. Ann Rheum Dis 57: 441.

Ahrens N, Pruss A, Kähne A, Kiesewetter H, Salama A (2007) Coexistance of autoantibodies and alloantibodies to red blood cells due to blood transfusion. Transfusion 47: 813-816.

Ahrens N, Pruss A, Mayer B, Genth R, Kiesewetter H, Salama A (2008) Association between alloantibody specificity and autoantibodies to red blood cells. Transfusion 48: 20-24.

Antoniou AN, Powis SJ, Elliott T (2003) Assembly and export of MHC class I peptide ligands. Curr Opin Immunol 15: 75–81.

Barcellini W, Fattizzo B, Cortelezzi A (2018) Autoimmune hemolytic anemia, autoimmune neutropenia and aplastic anemia in the elderly. Eur J Intern Med 58: 77-83.

Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A, Radice T, Nichele I, Di Bona E, Lunghi M, Tassinari C, Alfinito F, Ferrari A, Leporace AP, Niscola P, Carpenedo M, Boschetti C, Revelli N, Villa MA, Consonni D, Scaramucci L, De Fabritiis P, Tagariello G, Gaidano G, Rodeighiero F, Cortelezzi A, Zanella A (2014) Clinical heterogeneity and predictors of outcome in primary autoimmune haemolytic anemia: a GIMEMA study of 308 patients. Blood 124: 2930-2936.

Barcellini W, Zaja F, Zaninoni A, Imperiali FG, Battista ML, Di Bona E, Fattizzo B, Consonni D, Cortelezzi A, Fanin R, Zanella A (2012) Low-dose rituximab in adult patients with idiopathic autoimmune hemolytic anemia: clinical efficacy and biologic studies. Blood 119: 3691-3697.

Barcellini W (2015) New Insights in the Pathogenesis of Autoimmune Hemolytic Anemia. Transfus Med Hemother 42: 287-293.

Barker RN, de Sa Oliveira GG, Elson CJ, Lydyard PM (1993) Pathogenic autoantibodies in the NZB mouse are specific for erythrocyte band 3 protein. Eur J Immunol 23: 1723-1726.

Barker RN, Vickers MA, Ward FJ (2007) Controlling autoimmunity-Lessons from the study of red blood cells as model antigens. Immunol Lett 108: 20-26.

Bass GF, Tuscano ET, Tuscano JM (2014) Diagnosis and classification of autoimmune hemolytic anemia, Autoimmun Rev 13: 560-564.

Bell CA, Zwicker H, Sacks HJ (1973) Autoimmune hemolytic anemia: routine serologic evaluation in a general hospital population. Am J Clin Pathol 60: 903-911.

Benazet JF, Reviron D, Mercier P, Roux H, Roudier J (1995) HLA-DRB1 alleles associated with rheumatoid arthritis in Southern France. Absence of extraarticular disease despite expression of shared epitope. J Rheumatol 22: 607-610.

Berentsen S (2002) How I manage cold agglutinin disease. Br J Haematol 69: 258-271.

Berlingerio M, Bouchi F, Curcio M, Giannotti F, Turini F (2009). Mining Clinical, Immunological, and Genetic Data of Solid Organ Transplantation. U: Biomedical Data and Applications. Berlin, Heidelberg, Springer, 211-236.

Bettencourt A, Carvalho C, Leal B , Bras S , Lopes D , Martins da Silva A, Santos E , Torres T, Almeida I, Farinha F, Barbosa p, Marinho A, Selores M, Correia J, Vasconcelos C, Costa PP, Martins da Silva B (2015) The Protective Role of HLA-DRB1*13 in Autoimmune Diseases. Journal of Immunology Research: 1-6.

Bilate AM, Lafaille JJ (2012) Induced CD4+FoxP3+ regulatory T cells in immune tolerance, Annual Review of Immunology 30: 733-758.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Benett WS, Strominger JL, Wiley DC (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature 329: 506-512.

Bodmer WF (1972) Evolutionary significance of the HL-A system. Nature 237: 139-145.

Bodmer WF (1980) The HLA System and Disease. The Oliver Sharpey Lecture 1979 J R Coll Physicians Lond. 14: 43-50.

Bodmer WF, Trowsdale J, Young J, Bodmer J (1986) Gene clusters and the evolution of the major histocompatibility system. Phil Trans R Soc Lond B 312: 303-315.

Bodmer WF (1987) The HLA system: structure and function. J Clin Pathol 40: 948-958.

Branch DR, Petz LD (1999) Detecting alloantibodies in patients with autoantibodies. Transfusion 39: 6-10.

Branch DR, Petz LD (1982) A new reagent (ZZAP) having multiple applications in immunohematology. Am J Clin Pathol 78: 161-167.

Bryant P, Ploegh H (2004) Class II MHC peptide loading by the professionals. Current Opinion in Immunology 16: 96–102.

Ceppellini R, Curtoni ES, Mattiuz PL, Miggiano C, Scudeller G, Serra A (1967) Genetics of leukocyte antigens: a family study of segregation and linkage. U: Curtoni ES, Mattiuz PL, Tosi RM (ed.) Histocompatibility testing. Copenhagen; Munksgaard, 149–187.

Chaplin H Jr (1973) Clinical usefulness of specific antiglobulin reagents in autoimmune haemolytic anemias. Prog Hematol 7: 25-49.

Clark AG, Fan Q, Brady GF, Mackin KM, Coffman ED, Weston ML, Foster MH (2013) Regulation of basement membrane-reactive B cells in BXSB, (NZBxNZW)F1, NZB, and MRL/lpr lupus mice. Autoimmunity 46: 188–204.

Clauvel JP, Marcelli-Barge A, Gautier Coggia I, Poirier JC, Benajam A, Dausset J (1974) HL-A antigens and idiopathic autoimmune hemolytic anemias. Transplant Proc 6: 447-448.

Cobb BA, Wang Q, Tzianabos AO, Kasper DL (2004) Polysaccharide Processing and Presentation by the MHCII Pathway. Cell 117: 677-687.

Conley CL, Lippman SM, Ness P (1980) Autoimmune hemolytic anemia with retiulocytopenia: a medical emergency. JAMA 244: 1688-1690.

Cruz AC, Ramaswamy M, Ouyang C, Klebanoff CA, Sengupta P, Yamamoto TM, Meylan F, Thomas SK, Richoz N, Eil R, Price S, Casellas R, Rao K, Lippincott-Schwartz J, Restifo NP, Siegel RM (2016) Fas/CD95 prevents autoimmunity independently of lipid raft localization and efficient apoptosis induction. *Nat Commun* 7: 1-15.

Čulić S, Kuljiš D, Ivanković Z, Martinić R, Erceg-Maglić P, Pavlov N, Rešić B, Janković S, Primorac D (1999) Various triggers for autoimmune hemolytic anemia in childhood. Pediatr Croat 43: 207-210.

Da Costa JAG, White AG, Parker AC, Grigor GB (1974) Increased incidence of HL-A 1 and 8 in patients showing IgG or complement coating on their red cells. J Clin Pathol 27: 353-355.

Dacie J (1992) Auto-immune haemolytic anaemia (AIHA): warm-antibody syndromes I: „idiopathic“ types: history and clinical features. U: Dacie J (ed.) The Haemolytic Anaemias, Vol. 3. London: Churchill Livingstone, 15

Das SS, Chaudhary R (2009) Utility of adsorption techniques in serological evaluation of warm autoimmune haemolytic anaemia. Blood Transfus 7: 300-304.

Das SS, Nityanand S, Chaudhary R (2009) Clinical and serological characterisation of autoimmune haemolytic anemia in a tertiary care hospital in North India. Ann Hematol 88: 727-732.

Dausset J, Colombani J (1959) The serology and the prognosis of 128 cases of autoimmune haemolytic anemia. Blood 14: 1280-1301.

Dausset J (1954) Leuco-agglutins IV, leuco-agglutinins and blood transfusion. Vox sangunis 4: 190-198.

Dausset J (1958) Iso-leuco-anticorps. Acta Haemat 20: 156-166.

De Loughery TG (2013) Autoimmune Hemolytic Anemia. U: Litchkofski R (ed.) Hospital Physician Hematology Board Review Manual. Turner White Communications Inc 2-12.

De Luca, F. and Shoenfeld, Y (2019) The microbiome in autoimmune diseases. Clin Exp Immunol 195: 74-85.

Dehner C, Fine R, Kriegel MA (2019) The Microbiome in Systemic Autoimmune Disease – Mechanistic Insights from Recent Studies. Curr Opin Rheumatol 31: 201–207.

Dražić V, Grahovac B, Bingulac-Popović J**,** Babić I, Balija M, Grgičević D (2000) Allele and haplotype frequencies for HLA class I loci in Croatian population. Vox Sang 79 (suppl 1): 583.

Dražić V, Grahovac B, Bingulac-Popović J**,** Babić I, Balija M, Grgičević D (2001) Allele and haplotype frequencies for HLA class II loci in Croatia. Transfus Clin Biol 8 (suppl 1): 163.

Ebringer R, Cawdell DR, Cowling P, Ebringer A (1978) Sequential studies in ankylosing spondylitis: Association of Klebsiella pneumoniae with active disease. Ann Rheum Dis 37: 146-151.

Ehrlich P, Morgenroth J (1900) Über Hämolysine. Dritte Mittheilung.Berl. klin. Wsch 37: 453-458.

Ehrlich P (1904) Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung. Verlag von August Hirschwald, Berlin 776.

Engelfriet CP, Overbeeke MA, von dem Borne AE (1992) Autoimmune haemolytic anemia. Semin Hematol 29: 3-12.

Erlich, H., Valdes, A. M., Noble, J., Carlson, J. A., Varney, M., Concannon, P. Mychaleckyj JC, Todd JA, Bonella P, Fear AL, Lavant E, Louey A, Moonsamy P, for the Type 1 Diabetes Genetics Consortium (2008) HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. Diabetes 57: 1084-1092.

Evans RS, Duane RT (1949) Acquired hemolytic anemia: I. The relation of erythrocyte antibody production to activity of the disease: II. The significance of thrombocytopenia and leukopenia. Blood 4: 1196-1213.

Evans RS, Weiser RS (1957) The serology of autoimmune haemolytic disease: observations on forty-one patients. Arch Intern Med 100: 371-399.

Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR (2008) Sex differences in Autoimmune Disease from a Pathological Perspective. Am J of Pathology 173: 600-609.

Fattizzo B, Zaninoni A, Nesa F, Sciumbata VM, Zanella A, Cortelezzi A, Barcellini W (2015) Lessons from very severe, ractory and fatal primary autoimmune hemolytic anemias. Am J Hematol 90: 149-151.

Fernando MMA, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, Vyse TJ, Rioux JD (2008) Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis. PloS Genet 4: 1-9.

Flegar-Meštrić Z, Preden-Kereković V, Vrhovski-Hebrang D, Šurina B, Nazor A (2000) Referentne vrijednosti biokemijskih i hematoloških sastojaka krvi i seruma zdravih osoba u dobi od 8 do 70 godina. Biochemia Medica 10: 1-9.

Franks LL, Slansky JE (2012) Review: Multiple Associations Between a Broad Spectrum of Autoimmune Diseases, Chronic Inflammatory Diseases and Cancer. Anticancer Res 32: 1119-1136.

Garcia-Alvarez M, Alcoceba M, Lopez-Parra M, Puig N, Anton A, Balanzategui A, Prieto-Conde I, Jimenez C, Sarasquete ME, Chillon MC, Gutierrez ML, Corral R, Alonso JM, Queizan JA, Vildan J, Pardal E, Penarrubia MJ, Bastida JM, Garcia-Sanz R, Marin L,

Gonzalez M (2017) HLA specifities are associated with prognosis in IGHV-mutated CLL-like high-count monoclonal B cell lymphocytosis. PloS ONE 12: 1-14.

Garratty G (2004) Autoantibodies induced by blood transfusion. Transfusion 44: 5-9.

Garratty G (1989) Factors affecting the pathogenicity of red cell auto- and alloantibodies. U: Nance SJ (ed.) Immune destruction of red blood cells. Arlington, VA: American Association of Blood Banks, 109.

Gehrs BC, Friedberg RC (2002) Autoimmune Hemolytic Anemia. Am J Hematol 69: 258-271.

Genty I, Michel M, Hermine O, Schaeffer A, Godeau B, Rochant H (2002) Characteristics of autoimmune haemolytic anemia in adults: retrospective analysis of 83 cases. Rev Med Interne 23: 901-909.

Gorer PA (1936) The detection of a hereditary genetic difference in the blood of mice by means of human group A serum. J Genet 32: 17-31.

Gorer PA, Lyman S, Snell GD (1948) Studies on the genetic and antigenic basis of tumor transplantation. Linkage between a histocompatibility gene and “fused” in mice. Proc R Soc Lond B Biol Sci 135: 499-505.

Gorst DW, Rawlinson VI, Merry AH, Stratton F (1980) Positive direct antiglobulin test in normal individuals. Vox Sang 38: 99-105.

Gough SCL, Simmonds MJ (2007) The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action. Curr Genomics 8: 453-465.

Graeber KE, Olsen NJ (2012) Th17 cell cytokine secretion profile in host defense and autoimmunity. Inflamm Res 61: 87-96.

Gragert L, Fingerson S, Albrecht M, Maiers M, Kalaycio M, Hill BT (2014) Fine- mapping of HLA associations with chronic lymphocytic leukemia in US populations. Blood 124: 2657-2665.

Granfors K, Toivanen A (1986) IgA-anti-Yersinia antibodies in Yersinia triggered reactive arthritis. Ann Rheum Dis 45: 561-565.

Granfors K, Jalkanen S, Lindberg AA, Maki-Ikola O, von Essen R, Lahesmaa-Rantala R, Isomaki H, Saario R, Arnold WJ, Toivanen A (1990) Salmonella lipopolysaccharide in synovial cells from patients with reactive arthritis. Lancet 335: 685-688.

Granfors K, Jalkanen S, Toivanen P, Koski J, Lindberg AA (1992) Bacterial lipopolysaccharide in synovial fluid cells in Shigella triggered reactive arthritis. J Rheumatol 19: 500.

Greenwald R. J., Boussiotis V. A., Lorsbach R. B., Abbas A. K., Sharpe A. H (2001) CTLA-4 regulates induction of anergy *in vivo*. Immunity 14: 145–155.

Griffith TS, Ferguson TA (2011) Cell death in the maintenance and abrogation of tolerance: the five Ws of dying cells. Immunity 354: 456–466.

Grubić Z (2019) Uloga gena sustava HLA u endokrinim bolestima i šećernoj bolesti tipa 1. Pediatr Croat 63: 69-74.

Grubić Z, Perić P, Čečuk-Jeličić E, Žunec R, Ćurković B, Kerhin-Brkljačić V (2004) Raspodjela alela HLA razreda I i II u bolesnika s psorijatičnim artritisom u Hrvatskoj. Reumatizam 51: 5-11.

Grubić Z, Žunec R, Čečuk-Jeličić E, Kerhin-Brkljačić V, Kaštelan A (2000) Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 haplotypes in a Croatian population. Eur j Immunogenet 27: 47-51.

Grubić Z, Žunec R, Naipal A, Kaštelan A, Giphart MJ (1995) Molecular analysis of HLA class II polymorphism in Croatians. Tissue Antigens 46: 293-298.

Grubic Z, Burek Kamenaric M, Mikulic M, Stingl Jankovic K, Maskalan M, Zunec R (2014) HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. International Journal of Immunogenetics 41: 211-221.

Hall AM, Zamzami OM, Whibley N, Hampsey DP, Haggart AM, Vickers MA, Barker RN (2012) Production of the effector cytokine interleukin-17, rather than interferon-gamma, is more strongly associated with autoimmune hemolytic anemioa. Haematologica 9710: 1494-1500.

Haspl ZH, Tomicic M, Grgicevic D (2001) Clinically significant red cell alloantibodies in patients with warm autoimmune haemolytic anemia. Acta Med Croatica 55: 149-152.

Henry-Bonami RA, Williams JM, Rachakonda AB, Karamali M, Kendall PL, Thomas JW (2013) B lymphocyte "original sin" in the bone marrow enhances islet autoreactivity in type 1 diabetes-prone nonobese diabetic mice. J Immunol 190: 5992–6003.

Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Bouillet P, Strasser A, Kappler J, Marrack P (2002) Activated T cell death *in vivo* mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. Immunity 16: 759–767.

Hoppe B, Stibbe W, Bielefeld A, Pruss A, Salama A (2001) Increased RBC autoantibody production in pregnancy. Transfusion 41: 1559-1561.

Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, et al (2004) Gene map of the extended human MHC. Nat Rev Genet 5: 889-899.

Howson JMM, Roy MS, Zeitels L, Stevens H, Todd JA (2013) HLA class II gene associations in African American Type 1 diabetes reveal a protective HLA-DRB1*03 haplotype. Diabet Med 30: 710-716.

Hsieh CS, Lee HM, Lio CW (2012) Selection of regulatory T cells in the thymus. Nat Rev Immunol 12: 157–167.

Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY (2004) Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. Immunity 21: 267–277.

Hu X, Daly M (2012) What have we learned from six years of GWAS in autoimmune diseases, and what is next? Current Opinion in Immunology 24: 571-575.

Husby G, Tsuchiya N, Schwimmbeck PL, Keat A, Pahle JA, Oldstone MBA, Williams RC Jr (1989) Cross-reactive epitope with Klebsiella pneumoniae nitrogenase in articular tissue of HLA-B27+ patients with ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum 32: 437-445.

Isakson SH, Katzman SD, Hoyer KK (2012) Spontaneous autoimmunity in the absence of IL-2 is driven by uncontrolled dendritic cells. J Immunol 189: 1585–1593.

Issitt PD, Combs MR, Bumgarner DJ, Allen J, Kirkland A, Melroy-Carawan H (1996) Studies of antibodies in the sera of patients who have made red cell autoantibodies. Transfusion 36: 481-486.

Jensen PE (2007) Recent advances in antigen processing and presentation. Nat Immunol 8: 1041–1048.

Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S (2012) Cross-presentation by dendritic cells. Nature Reviews Immunology 12: 557-569.

Jog NR, Chakravarty EF, Guthridge JM, James JA (2018) Epstein Barr Virus Interleukin 10 Suppresses Anti-inflammatory Phenotype in Human Monocytes. Front Immunol 9: 2198.

Judd WJ, Johnson ST, Storry J. (2008) Judd's methods in immunohematology. 3rd edn. AABB Press, Bethesda

Kaštelan M, Prpić Massari, Brajac I, Peternel S, Čečuk Jeličić E, Grubić Z, Kaštelan A (2015) Učestalost haplotipskih sveza HLA-DRB1-DQA1-DQB1 u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze. medicina fluminensis 51: 283-288.

Kissmeyer-Nielsen F, Svejgaard A, Ahrons S, Staub-Nielsen LS (1969) Crossing-over within the HL-A system. Nature 224: 75-76.

Kleijmeer M, Ramm G, Schuurhuis D, Griffith J, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Rudensky AY, Ossendorp F, Melief CJM, Stoorvogel W, Geuze HJ (2001) Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. J. Cell Biol 155: 53–64.

Klitz W, Maiers M, Spellman S, Baxter-Lowe LA, Schmeckpeper B, Williams T.M, Fernandez-Viña M (2003) New HLA haplotype frequency erence standards: High-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans. Tissue Antigens 62: 296–307.

Kloetzel PM (2001) Antigen processing by the proteasome. Nat Rev Mol Cell Biol 2: 179–187.

Körmöczi GF, Mayr WR (2014) Responder individuality in red blood cell alloimmunization. Transfus Med Hemother 41: 446–451.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 cells. Annu Rev Immunol. 27: 485-517.

Koti K, Thumma RR, Nagarajan S, Mathi A (2013) Hashimoto's thyroiditis associated Evans syndrome: A rare case report on the clustered autoimmune disease triad. Indian J Endocrinol Metab 17: 736-739.

Kruhonja Galic Z, Jagnjic S, Bingulac-Popovic J, Planinc-Peraica A, Hecimovic A, Strauss Patko M, Jukic I (2020) Warm red blood cell autoantibodies and clinical diagnosis in patients with or without autoimmune hemolyses. Transfusion Clinique et biologique 27: 25-29.

Lai M, Leone G, Landolfi R (2013) Autoimmune Hemolytic Anemia With Gel-Based Immunohematology Tests. Am J Clin Pathol 139: 457-463.

Laktašić Žerjavić N, Soldo Jureša D, Babić-Naglić Đ, Ćurković B, Potočki K, Žunec R, Ivanišević G (2005) Raspodjela HLA-DRB1 gena u hrvatskih bolesnika s artritisom. Reumatizam 52: 12-16.

Lamoureux JL, Watson LC, Cherrier M, Skog P, Nemazee D, Feeney A (2007) Reduced receptor editing in lupus-prone MRL/lpr mice. J Exp Med 204: 2853–2864.

Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio CW, Santacruz N, Peterson DA, Stappenbeck TS, Hsieh CS (2011) Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. Nature 478: 250–254.

Lechner K, Jäger U (2010) How I treat autoimmune hemolytic anemias in adults. Blood 116: 1831-1838.

Leger RM, Garratty G (1999) Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantibodies. Transfusion 39: 11-16.

Lerner A, Matthias T (2015) Changes i intestinal tight junction permeability assiociated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. Autoimmunity Reviews 14: 479-489.

Liesveld JL, Rowe JM, Lichtman MA (1987) Variability of the erythropoetic response in autoimmune hemolytic anemia: analysis of 109 cases. Blood 69: 820-826.

Lin Y, Xu Z, Li X, Shan X, Fan D, Qiu Y, Chang H, Miao T (2017) Association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles with red blood cell auto-immunization in the Chinese population. Asia-Pacific Journal of Blood Types and Genes 1: 31-34.

Lippman SM, Arnett FC, Conley CL, Ness PM, Meyers DA, Bias B (1982) Genetic factors predisposing to autoimmune diseases: autoimmune hemolytic anemia, chronic thrombocytopenic purpura and systemic lupus erythematosus. Am J Med 73: 827-840.

Liu Y, Li L, Kumar KR, Xie C, Lightfoot S, Zhou Xj, Kearney JF, Weigert M, Mohan C (2007) Lupus susceptibility genes may breach tolerance to DNA by impairing receptor editing of nuclear antigen-reactive B cells. J Immunol 179: 1340–1352.

Lomas-Francis C (2008) Blood Group Genetics. U: Roback JD (ed.) Technical Manual, AABB Press, Bethesda, 325-360

Lortholary O, Valeyre D, Gayraud M, Casassus P, Battesi JP, Guillevin L (1990) Autoimmune haemolytic anaemia and idiopathic pulmonary fibrosis associated with HLA-B27 antigen. European Journal of Haematology 45: 112-113.

Luhder F, Chambers C, Allison JP, Benoist C, Mathis D (2000) Pinpointing when T cell costimulatory receptor CTLA-4 must be engaged to dampen diabetogenic T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 12204–12209.

Luning Prak ET, Monestier M, Eisenberg RA (2011) B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. Ann N Y Acad Sci 1217: 96–121.

Mack SJ, Tu B, Lazaro A, Yang R, Lancaster AK, Cao K, Ng J, Hurley CK (2009) HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele and haplotype frequencies distinguish Eastern European Americans from the general European American population. Tissue Antigens 73: 17-32.

Maluskova A, Mrazek F, Pauliskova M, Kovarova P, Koristka M, Jindra P, Cermakova Z (2017) Association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 with red-blood-cell alloimmunization in the Czech population. Vox Sang 112: 156-162.

Mangalam A, Taneja V, David CS (2013) HLA Class II Molecules Influence Susceptibility versus Protection in Inflammatory Diseases by Determinig the Cytokine Profile. The Journal of Immunology 190: 513-518.

Margaritte-Jeanin P, Babron MC, Louka AS, Clot F, Percopo S, Coto I, Hugot JP, Ascher H, Sollid LM, Greco L, Clerget-Darpoux F (2004) HLA-DQ relative risks for celiac disease in european populations: a study of the European genetics cluster on celiac disease. Tissue Antigens 63: 562-567.

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE , Dupont B, Erlich HA , Fernández-Vina M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Mayr WR, Maiers M, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J (2010) Nomenclature for factors of the HLA system. Tissue Antigens 75: 291-455.

Mattey DL, Hassell AB, Dawes PT, Cheung NT, Poulton KV, Thomson W, Hajeer AH, Ollier WE (2001) Independent Association of Rheumatoid factor and the HLA-DRB1 Shared Epitope With Radiographic Outcome in Rheumatoid Arthritis. Arthitis Rheum 44: 1529-1533.

Matzaraki, V., Kumar, V., Wijmenga, C, Zhernakova A (2017) The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. Genome Biol 18: 1-21.

Mazza G, el Idrissi ME, Coutelier JP, Corato A, Elson CJ, Pfau CJ, Day MJ (1997) Infection of C3HeB/FeJ mice with the docile strain of lymphocytic choriomeningitis virus induces autoantibodies specific for erythrocyte Band 3. Immunology 91: 239-245.

Meffre E (2011) The establishment of early B cell tolerance in humans: lessons from primary immunodeficiency diseases. Ann NY Acad Sci 1246:1–10.

Meng W, Li Y, Xue E, Satoh M, Peck AB, Cohen PL, Eisenberg RA, Lunning Prak ET (2012) B-Cell tolerance defects in the B6.Aec1/2 mouse model of Sjögren's syndrome. J Clin Immunol 32: 551–564.

Miescher P, Fauconnet M (1954) Mise en évidence de differents groupes leucocytaires chez l'homme. Schweiz. Med. Wochenschr 84: 597-599.

Mijandrušić Sinčić B, Starčević Čizmarević N, Licul V, Crnić-Martinović M, Ristić S, Kapović M (2016) HLA-DQA1 i HLADQB1 geni u pacijenata s celijakijom. medicina fluminensis 52: 87-94.

Moulton VR (2018) Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. Front Immunol 9: 2279.

Mu H, Chen JJ, Jiang Y, King MC, Thomson G, Criswell LA (1999) Tumor Necrosis Factor a Microsatellite Polymorphism is Associated with Rheumatoid Arthritis Severity through an Interaction with the HLA-DRB1 Shared Epitope. Arthritis Rheum 42: 438-442.

Murphy, KP. Janeway's immunobiology I Kenneth Murphy with acknowledgment to Paul Travers, Mark Walport ; with contributions by Allan Mowat, Casey T. Weaver. (8th edn.) Garland Science, Taylor & Francis Group, New York

Muto M, Nagai K, Mogami S, Nakano J, Sasazuki T, Asagami C (1995) HLA antigens in Japanese patients with psoriatic arthritis. Tissue Antigens 45: 362-364.

Nagele EP, Han M, Acharya NK, DeMarshall C, Kosciuk MC, Nagele RG (2013) Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. PloS One 8: 1-8.

Naysmith JD, Ortega-Pierres MG, Elson CJ (1981) Rat erythrocyte-induced anti-erythrocyte autoantibody production and control in normal mice. Immunol Rev 55: 55-87.

Nemazee D (2017) Mechanisms of central tolerance for B cells. Nat Rev Immunol 17: 281–294.

Nickel RS, Horan JT, Fasano RM, Meyer E, Josephson CD, Winkler AM, Yee ME, Kean LS, Hendrickson JE (2015) Immunophenotypic parameters and RBC alloimmunization in children with sickle cell disease on chronic transfusion. Am J Hematol 90: 1135-1141.

Nishimura H., Nose M., Hiai H., Minato N., Honjo T (1999) Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. Immunity 11: 141–151.

Noack M, Miossec P (2014) Th17 and regulatory T cell balancein autoimmune and inflammatory diseases. Autoimmun Rev 3: 668-677.

Noble JA (2015) Immunogenetics of type 1 diabetes: a comprehensive review. J Autoimmun 64: 101-112.

Noble JA, Valdes AM, Varney MD, Carlson JA, Moonsamy P, Fear AL, Lane JA, Lavant E, Rappner R, Louey A, Concannon P, Mychaleckyj JC, Erlich HA, Type 1 Diabetes

Genetics Consortium (2010) HLA class I and genetic susceptibility to type 1- results from the type 1 diabetes genetics consortium. Diabetes 59: 2972-2979.

Noizat-Pirenne F, Tournamille C, Bierling P, Roudot-Thoraval F, Le Pennec PY, Rouger P, Ansart-Pirenne H (2006) Relative immunogenecity of Fy^a and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. Transfusion 46: 1328-1333.

Nomura S, Okamae F, Matsuzaki T, Ishida T, Fukuhara S (1998) Autoimmune Hemolytic Anemia and HLA-DQ6. Autoimmunity 28: 57-58.

Ogasawara M, Kono DH, Yu DTY (1986) Mimicry of human histocompatibility HLA-B27 antigens by Klebsiella pneumoniae. Infect Immun 51: 901-908.

Pacholczyk R, Ignatowicz H, Kraj P, Ignatowicz L (2006) Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. Immunity 25: 249–259.

Packman CH (2015) The Clinical Pictures of Autoimmune Hemolytic Anemia. Transfus Med Hemother 42: 317-324.

Park SH, Choe WH, Kwon SW (2015) Red blood cell transfusion in patients with autoantibodies: is it effective and safe without increasing hemolyses risk? Ann Lab Med 35: 436-444.

Payne R, Rolfs MR (1958) Fetomaternal leukocyte incompatibility. J. Clin. Invest 37: 1756-1763.

Payne R, Tripp M, Weigl J, Bodmer W, Bodmer J (1964) A new leukocyte isoantigen system in man. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 29: 285-295.

Pera C., Delfino L, Longo A, Pistilo MP, Ferrara GB (2000) Novel associations among HLA-DQA1 and DQB1 alleles, revealed by high-resolution sequence-based typing (SBT). Tissue Antigens 55: 275-279.

Petz LD, Garratty G (editors) (1980) Acquired immune haemolytic anemias. 1st edn. New York: Churchill Livingston

Petz LD (2004) A physician′s guide to transfusion in autoimmune haemolytic anaemia. Br J Haematol 124: 712-716.

Picard C, Frassati C, Basire A, Buhler S, Galicher V, Ferrera V, Reviron D, Zappitelli JP, Bailly P, Chiaroni J (2009) Positive association of DRB1*04 and DRB1*15 alleles with Fy^a immunization in a Southern European population. Transfusion 49: 2412-2417.

Pirofsky B (1968) Hereditary aspects of autoimmune hemolytic anemia: a retrospective analysis [abstract]. Vox Sang 14: 334-347.

Pohar J, Simon Q, Fillatreau S (2018) Antigen-Specificity in the Thymic Development and Peripheral Activity of $CD4^+FOXP3^+$ T Regulatory Cells. Front Immunol 9: 1-10.

Pritchard NR, Smith KG (2003) B cell inhibitory receptors and autoimmunity. Imunology 108: 263-273.

Raos M, Zunec R, Mocibob M, Gojceta K, Lukic M, Golubic Cepulic B (2019) Susceptible and protective HLA-DR and HLA-DQ alleles for Fy^a alloimmunization in the Croatian population. Transfusion 59: 1118-1124.

Reviron D, Dettori I, Ferrera V, Legrand D, Touinssi M, Mercier P, De Micco P, Chiaroni J (2005) HLA-DRB1 alleles and Jk^a immunization. Transfusion 45: 956-959.

Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE (2015) The IPD and IPD-IMGT/HLA Database: allele variant databases. Nucleic Acids Research 43: 423-431.

Rojnić Putarek (2015) Doktorska disertacija. Povezanost biljega polimorfizma gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 te specifičnih autoantitijela protiv beta stanica Langerhansovih otočića s nastankom dijabetesa melitusa tipa 1 u bolesnika s autoimunom bolešću štitnjače. Medicinski fakultet Sveučilište u Zagrebu.

Romanos J, van Diemen CC, Nolte IM, Trynka G, Zhernakova A, Fu J, Bardell MT, Barisani D, McManus R, van Heel DA, Wijmenga C (2009) Analysis of HLA and non-HLA alleles can identify individuals at high risk for celiac disease. Gastroenterology 137: 834-840.

Salama A, Ahrens N, Kiesewetter H (2002) Serological and Clinical Aspects of Autoimmune Hemolytic Anemias. Infus Ther Transfus Med 29: 206-217.

Sanchez-Mazas A, Buhler S, Nunes JM (2013) A New HLA Map of Europe: Regional Genetic Variation and Its Implication for Peopling History, Disease-Association Studies and Tissue Transplantation. Hum Hered 76: 162-177.

Sant A, Yewdell J (2003) Antigen processing and recognition. Curr Opin Immunol 15: 66–68.

Sazonovs A, Kennedy NA, Moutsianas L, Heap GA, Rice DL, Reppell M, Bewshea CM, Chanchlani N, Walker GJ, Perry MH, McDonald TJ, Lees CW, Cummings JRF, Parkes M, Mansfield JC, Irving PM, Barrett JC, McGovern D, Goodhand JR, Anderson CA, Ahmad T, PANTS Consortium (2020) HLA-DQA1*05 Carriage Associated With Development of Anti-Drug Antibodies to Infliximab and Adalimumab in Patients With Crohn's Disease. Gastroenterology 158: 189-199.

Schmitt-Egenolf M, Boehncke WH, Ständer M, Eiermann TH (1993) Oligonucleotide typing reveals association of type I psoriasis with the HLA DRB1*0701/02, -DQA1*02:01-, DQB1*03:03 extended haplotype. J Invest Dermatol 100: 749-752.

Schneider-Hohendorf T, Görlich D, Savola P, Kelkka T, Mutsjoki S, Gross CC, Owens GC, Klotz L, Dornmair K, Wiendl H, Schwab N (2018) Sex bias in MHC I-associated shaping of the adaptive immune system. Proc Natl Acad Sci U S A 115: 2168–2173.

Schoenwille H, Doxiadis II, Levering WH, Roelen DL, Class FH, Brand A (2014) HLA-DRB1 associations in individuals with single and multiple clinically relevant red blood cell antibodies. Transfusion 54: 1971-1980.

Schwimmbeck PL, Yu DTY, Oldstone MBA (1987) Autoantibodies to HLA B27 in the sera of HLA B27 patients with ankylosing spondilitis amd Reiter's syndrome. Molecular mimicrya with Klebsiella pneumoniae as a potential mechanism of autoimmune disease. J. Exp Med 166: 173-181.

Simmonds MJ, Howson JM, Heward JM, Carr-Smith J, Franklyn JA, Todd JA, Gough SC (2007) A novel and major association of HLA-C in Grave's disease that eclipses the classical HLA-DRB1 effect. Hum Mol Genet 16: 2149-2153.

Singhal D, Kutyna MM, Chhetri R, Wee LYA, Hague S, Nath L, Nath SV, Sinha R, Wickham N, Lewis ID, Ross DM, Bardy PG, To LB, Reynolds J, Wood EM, Roxby D, Hiwase DK (2017) Red cell alloimmunization is associated with development of autoantibodies and increased red cell transfusion requirements in myelodisplastic syndrome. Hematologica 102: 2012-2029.

Smirnova S, Khamaganova E, Sidorova Y, Abakumova A, Urbyn I, Sudarikov A. HLA-DR alleles associated with the development of autoimmune hemolytic anemia.(Abstract) U: HemaSphere. Abstract Book of the 23rd European Hematology Association Congress, 2018 June 14-17; Stockholm, Sweden. 893-894.

So CC, Wong KF, Yu PH, Kwan AMY, Lee AWC (2000) Alloimmunization in Chinese with warm autoimmune haemolytic anaemia – incidence and characteristics. Transf Med 10: 141-143.

Söderberg-Nauclér C (2012) Autoimmunity induced by human cytomegalovirus in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther 14: 101.

Sokol RJ, Hewitt S, Stamps BK (1981) Autoimmune haemolysis: an 18-year study of 865 cases erred to a regional transfusion centre. Br Med J 282: 2023-2027.

Sprent J, Kishimoto H (2002) The thymus and negative selection. Immunol. Rev 185: 126–135.

Starzynski RR, Cannone-Hergaux F, Willemetz A, Gralak MA, Wolinski J, Stys A, Olszak J, Lipinski P (2009) Haemolytic anaemia and alterations in hepatic iron metabolism in aged mice lacking Cu,Zn-superoxide dismutase. Biochem J 420: 383-390.

Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W (1999) An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. Ann. Intern. Med. 130: 591–601.

Sprent J, Kishimoto H. (2002) The thymus and negative selection. Immunol. Rev 185: 126–135.

Sürücü G, Mayer B, Märzacker A, Yürek S, Salama A (2015) Harmless Pregnancy-Induced Warm Autoantibodies to Red Blood Cells. Transfus Med Hemother 42: 325-327.

Svejgaard A, Ryder LP (1994) HLA and disease associations: detecting the strongest association. Tissue Antigens 43: 18-27.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. J. Exp. Med 192: 303–310.

Tatari-Calderone Z, Gordish-Dressman H, Fasano R, Riggs M, Fortier C, Campbell AD, Charron D, Gordeuk VR, Luban NLC, Vukmanovic S, Tamouza R (2016) Protective Effect of HLA-DQB1 Alleles Against Alloimmunization in Patients with Sickle Cell Disease. Hum Immunol 77: 35-40.

Teh CE, Daley SR, Enders A, Goodnow CC (2010) T-cell regulation by casitas B-lineage lymphoma (Cblb) is a critical failsafe against autoimmune disease due to autoimmune regulator (Aire) deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 14709–14714.

Terasaki P, McClelland JD (1964) Microdroplet assay of human serum cytotoxins. Nature 204: 998-1000.

Thorsby E (2009) A history of HLA. Tissue Antigens 74: 101-116.

Thorsby E, Piazza A (1975) Joint report from the sixth international histocompatibility workshop conference. II. Typing for HLA-D (LD-1 or MLC) determinants. U: Kissmeyer-Nielsen F (ed.) Histocompatibility Testing. Copenhagen, Munksgaard, 414-458

Thorsby E, Sandberg L, Lindholm A, Kissmeyer-Nielsen F (1970) The HL-A system: evidence of a third sub-locus. Scand J Haemat 7: 195-200.

Tian L, Hou L, Wang L, Xu H, Xiao J, Ying B (2018) HLA-DRB1*09:01 allele is associated with anti-E immunization in a Chinese population. Transfusion 58: 1536-1539.

Tivol E. A., Borriello F., Schweitzer A. N., Lynch W. P., Bluestone J. A., Sharpe A. H. (1995) Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. Immunity 3: 541–547.

Toolis F, Parker AC, White A, Urbaniak S (1977) Familial autoimmune haemolytic anaemia. Br Med J 1: 1392.

Toriani-Terenzi C, Fagiolo E (2005) IL-10 and the cytokine network in the pathogenesis of human autoimmune hemolytic anemia. Ann NY Acad Sci 1051: 29-44.

Toussirot E, Benoit A, Tiberghien P, Chabod J, Cedoz JP, Wendling D (1999) HLA-DRB1 alleles and Shared Amino Acid Sequences in Disease Susceptibility and Severity in Patients from Easzern France with Rheumatoid Arthritis. J Rheumatol 26: 1446-1451.

Valdes AM, Erlich HA, Noble JA (2005) Human leukocyte antigen class I B and C loci contribute to type 1 diabetes (T1D) susceptibility and age at T1D onset. Hum Immunol 66: 301-313.

Van Rood JJ, Eernisse JG, van Leeuwen A (1958) Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. Nature 181: 1735-1736.

van Rood JJ, van Leeuwen A (1963) Leucocyte Grouping. A Method and Its Application. J Clin Invest 42: 1382-1390.

Verduin EP, Brand A, van de Watering LMG, Roelen DL, Kanhai HHH, Doxiadis IIN, Claas FHJ, Schoenwille H (2016) The HLA-DRB1*15 phenotype is associated with multiple red blood cell and HLA antibody responsiveness. Transfusion 56: 1849-1856.

Verkoczy LK, Martensson AS, Nemazee D (2004) The scope of receptor editing and its association with autoimmunity. Curr Opin Immunol 16: 808–814.

Vijayakrishnan L., Slavik J. M., Illes Z., Greenwald R. J., Rainbow D., Greve B., Peterson L. B., Hafler D. A., Freeman G. J., Sharpe A. H., Wicker L. S., Kuchroo V. K. (2004) An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. Immunity 20: 563–575.

Voight BF, Cotsapas C (2012) Human genetics offers an emerging picture of common pathways and mechanisms in autoimmunity. Current Opinion in Immunohematology 24: 552-557.

Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL (2008) The known unknowns of antigen processing and presentation. Nat Rev Immunol 8: 607–618.

Wajant H (2002) The Fas signaling pathway: more than a paradigm. Science 296: 1635–1636.

Walker LS, Sansom DM (2011) The emerging role of CTLA-4 as a cell extrinsic regulator of T cell responses. Nature Reviews Immunology 11: 852-863.

Wang-Rodriguez J, Rearden A (1996) Reduced frequency of HLA-DQ6 in individuals with positive direct antiglobulin test. Transfusion 36: 979-984.

Ward FJ, Hall AH, Cairns LS, Leggat AS, Urbaniak SJ, Vickers MA, Barker R (2008) Clonal regulatory T cells specific for a red blood cell autoantigen in human autoimmune hemolytic anemia. Blood 111: 680-687.

Wheeler CA, Calhoun L, Blackall DP (2004) Warm reactive autoantibodies: clinical and serologic correlations. Am J Clin Pathol 122: 680-685.

Wilson C, Ebringer A, Ahmadi K, Wrigglesworth J, Tiwana H, Fielder M, Binder A, Ettelaie C, Cunningham P, Joannou C (1995) Shared amino acid sequences between major histocompatibility complex class II glycoproteins, type XI collagen and Proteus mirabilis in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 54: 216-220.

Winchester R (2019) A simple guide to the interpretation of the significance of the association of a disease with a particular HLA allele. Swiss Med Wkly149:w20128.

Worlledge SM (1978) The interpretation of a positive direct antiglobulin test. Br j Haematol 39: 157-162.

Yadav M, Stephan S, Bluestone JA (2013) Peripherally induced tregs – role in immune homeostasis and autoimmunity. Front Immunol 4: 1-12.

Yelamos J, Garcia-Lozano JR, Moreno I, Aguilera I, Gonzalez MF, Garcia A, Nunez-Roldan A, Sanchez B (1993) Association of HLA-DR4-Dw15 (DRB1*0405) and DR10 with rheumatoid arthritis in a Spanish population. Arthritis Rheum 36: 811-814.

Yewdell JW (2005) The seven dirty little secrets of major histocompatibility complex class I antigen processing. Immunol Rev 207: 8–18.

Young PP, Uzieblo A, Trulock E, Lublin DM, Goodnough LT, (2004) Autoantibody formation after alloimmunisation: are blood transfusions a risk factor for autoimmune hemolytic anemia? Transfusion 44: 67-72.

Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuji M, Meffre E, Pascual V, Nussenzweig MC (2005) Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. J Exp Med 201: 703–711.

Zamani M, Spaepen M, Bex M, Bouillon R, C assiman JJ (2000) Primary role of the HLA class II DRB1*0301 allele in Graves disease. Am J Med Genet 95: 432-437.

Zanelli E, Breedveld FC, de Vries RR (2000) HLA association with autoimmune disease: a failure to protect? Rheumatology 39: 1060-1066.

Zantek ND, Koepsell SA, Tharp Jr DR, Cohn CS (2012) The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis. Am J Hematol Jul 87: 707-709.

Zeerleder S (2011) Autoimmune haemolytic anaemia – a practical guide to cope with a diagnostic and therapeutic challenge. Neth J Med 69: 177-184.

Zenewicz L, Abraham L, Flavell RA, Cho J (2010) Unraveling the genetics of autoimmunity. Cell 140: 791-797.

Zinkernagel RM, Doherty PC (1974) Restriction of *in vitro* T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature 248: 701-702.

Žunec R, Grubić Z, Jurčić Z, Peršić M, Kaštelan A, Kerhin-Brkljačić V (2004) HLA-DQ2 heterodimer in the diagnosis of celiac disease. Biochemia Medica 14: 119-124.

European Molecular Biology Laboratory [Internet]. Hinxton:IMGT/HLA Database. Release 3.36.0, 2019-04-17 [citirano 7.5.2019]. Pristupljeno preko: https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/#

https://web.stanford.edu/dept/HPS/transplant/html/hla.html (*pristupljeno 20.11.2019.)*

IMGT/HLA Database. (*pristupljeno 20.11.2019*.) preko: https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/#.

8. ŽIVOTOPIS

Zrinka Kruhonja Galić je rođena 27.03.1970. u Zagrebu, gdje je pohađala osnovnu školu i Matematičko-informatički obrazovni centar. 1994. je diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 1995. do 1997. odrađuje pripravnički staž u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu gdje se nakon položenog državnog ispita i zapošljava. Sedam godina je radila kao liječnik u sastavu terenskih ekipa HZTM u Odjelu za promidžbu i dobrovoljno davanje krvi, nakon čega odlazi na specijalizaciju iz transfuzijske medicine, koju završava 2007. godine. Od tada neprekidno radi u odjelu za imunohematologiju, a 2017. postaje voditelj Odjela za eritrocitnu dijagnostiku.

Tijekom studija medicine od 1989.-1990. sudjelovala je u nastavi kao demonstrator na Katedri za fiziku, a od 2006. do 2013. kao vanjski suradnik u nastavi na Zdravstvenom učilištu u Zagrebu.

Član je radne skupine za izradu Kliničkih smjernica Hrvatskog društva za transfuzijsku medicinu. Sudjeluje u aktivnostima na više domaćih i međunarodnih tečajeva, kongresa, kao predavač te autor ili koautor 30-ak kongresnih priopćenja.

Prošla je izobrazbu prema normama ISO 9001:2008, DNL i HR EN ISO 15189.

Član je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za transfuzijsku medicinu i International Society of Transfusion Medicine.

Na samom početku radnog vijeka, zauvijek ju je oblikovao upravo terenski rad s dobrovoljnim darivateljima krvi. Danas joj je područje užeg stručnog i znanstvenog interesa imunohematologija i liječenje krvnim pripravcima.

U akademskoj godini 2012/2013 upisala je znanstveni doktorski studij na Biološkom odsjeku, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Vijeće biološkog odsjeka PMF-a odobrilo joj je temu 17. lipnja 2015., a Senat Sveučilišta u Zagrebu 21. srpnja 2015. donio odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti.

Udata je i majka dviju kćeri.

Rad citiran u bazi radova *Current Contents* povezan s temom doktorskog rada:
Kruhonja Galic Z, Jagnjic S, Bingulac-Popovic J, Planinc-Peraica A, Hecimovic A, Strauss Patko M, Jukic I. Warm red blood cell autoantibodies and clinical diagnosis in patients with or without autoimmune hemolyses. Transfusion Clinique et biologique 27 (2020) 25-29.