

Utvrđivanje razine izohemaglutinina u zdravoj populaciji Republike Hrvatske

Hećimović, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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:217:462912>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ana Hećimović

**UTVRĐIVANJE RAZINE
IZOHEMAGLUTININA U ZDRAVOJ
POPULACIJI REPUBLIKE HRVATSKE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2017



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ana Hećimović

**DETERMINATION OF ISOHEMAGGLUTININ
LEVEL IN HEALTHY POPULATION OF
CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017

Ovaj doktorski rad izrađen je u Odjelu za pripravu testnih reagensija Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i u Laboratoriju za imunologiju Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. prim. Maje Tomičić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija Biologije, pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem mojoj mentorici dr. sc. prim. Maji Tomičić na savjetima i idejama koji su pridonijeli izradi ovog rada. Svojim znanjem i iskustvom vodila me je tijekom izrade rada.

Posebnu zahvalnost dugujem dr. sc. prim. Željki Hundrić-Hašpl i dr. Ivanki Bosanac na poticaju i velikoj potpori u mojim prvim koracima i što su svoju strast prema imunohematologiji prenijele na mene.

Zahvaljujem se vodstvu Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu na prijateljskoj, kolegijalnoj i iskrenoj potpori.

Posebno se zahvaljujem djelatnicama Odjela za pripravu testnih reagencija Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu na uloženom trudu i pomoći koja je imala veliku važnost za ovaj rad. Njihova pristupačnost i pozitivnost odlikuje ih odličnim suradnicama i prijateljima.

Dr. sc. Krešo Bendelja iz Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu puno mi je pomogao svojim nadahnućem i savjetima. Zahvalnosti dugujem dipl. ing. Branki Krnić iz Imunološkog zavoda d.d. na potpori i ustupanju potrebnih reagensa.

Zahvalnost dugujem i svim suradnicima iz Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, a posebno djelatnicima Odjela za davalatstvo krvi, na nesebičnom zalaganju prilikom sakupljanja uzoraka.

Dobrovoljnim davateljima krvi zahvaljujem na pristanku za sudjelovanje u ispitivanjima.

Svim mojim dragim prijateljima zahvaljujem na velikoj podršci.

Posebno se zahvaljujem mojim najdražima, mojoj obitelji, na strpljenju i ljubavi.

UTVRĐIVANJE RAZINE IZOHEMAGLUTININA U ZDRAVOJ POPULACIJI REPUBLIKE HRVATSKE

Ana Hećimović

Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu

Važnost sustava eritrocitnih antigena određena je biološkom aktivnošću antitijela na antigene stanica tih sustava.

ABO-izohemaglutinini (IH) dio su sustava krvnih grupa ABO te imaju važnu ulogu u ishodu transfuzijske terapije i transplantacije organa. Zastupljenost ABH-antigena na stanicama različitog podrijetla određuje njihovu važnost u reakciji primatelja protiv presatka, a kod transfuzije krvi sudjeluju u neželjenoj reakciji davatelja protiv primatelja.

IH obilježava raznovrsnost po specifičnosti, imunoglobulinskim razredima i neujednačenim razinama antitijela u serumu, što se dovodi u vezu s demografskim obilježjima i etnografskim podrijetlom, koje je podložno utjecaju okoline, kao što je izloženost mikroorganizmima, alergenima, prehrani i cijepljenju. Zbog nejasne etiologije pretpostavlja se da izlaganje ubikvitarnim antigenima, uslijed podudarnosti s antigenima krvnih grupa ABO, potiče njihov nastanak.

Istraživanjem je utvrđena razina i zastupljenost razreda IH u krvi zdrave populacije te je prosuđen utjecaj ABO-antigenog statusa, dobi, spola i godišnjih doba na količinu IH.

Imunoenzimskom metodom utvrđena je direktna veza imunoreakcije IH s uobičajenim respiratornim alergenima kao moguća posljedica križne reaktivnosti.

(90 stranica, 47 slika/grafova, 19 tablica, 77 literaturnih navoda, jezik izvornika - hrvatski)

Ključne riječi: ABO-izohemaglutinini, sustav krvnih grupa ABO, križna reaktivnost, respiratorni alergeni

Mentor: *Dr. sc. prim. Maja Tomičić, dr .med.*

Ocjenjivači: *Doc. dr. sc. Petra Korać, Prof. dr. sc. prim. Ana Planinc-Peraica, dr. med.,
Dr. sc. Anica Horvat Knežević*

DETERMINATION OF ISOHEMAGGLUTININ LEVEL IN HEALTHY POPULATION OF CROATIA

Ana Hećimović

Croatian Institute of Transfusion medicine

Center for Research and Transfer of Knowledge in Biotechnology,

University of Zagreb

The role of red cell antigens is determined by biological antibody responses to systemic antigens. ABO-isohemagglutinins (IH) are part of the ABO blood group system, playing a major role in the outcome of transfusion therapy and organ transplantation. The presence of ABH-antigens on the cells of different origin determines their role in the graft *versus* host reaction, whereas in blood transfusion they are involved in the undesired donor-recipient reaction. IH are diversified by specificity, immunoglobulin classes and variable serum levels, which has been associated with demographic characteristics and ethnographic origin that is indirectly influenced by the environment, exposure to microorganisms, allergens, dietary habits and vaccination. Considering their unclear etiology, it has been postulated that the formation of IH is stimulated by the exposure to ubiquitous antigens due to compatibility with blood group antigens. In this study is determined the level and presence of IH classes in the blood of healthy Croatian population and assessed the impact of ABO antigen status, age, sex and season on IH level modification. The immunoenzymatic method was used to determine direct relationship of IH immunoreactions to common respiratory allergens as a possible consequence of cross-reactivity.

(90 pages, 47 figures, 19 tables, 77 references, original in Croatian)

Key words: ABO-isohemagglutinins, ABO blood group system, cross-reactivity, respiratory allergens

Supervisor: *Primarius Maja Tomičić, MD, PhD*

Reviewers: *Assistant professor Petra Korać, PhD, Professor Ana Planinc-Peraica, MD, PhD, Anica Horvat Knežević, PhD*

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	LITERATURNI PREGLED	4
2.1.	ABO-izohemaglutinini	4
2.1.1.	Definicija izohemaglutinina	4
2.1.2.	Nastanak ABO-izohemaglutinina	4
2.1.3.	Građa ABO-izohemaglutinina	10
2.1.4.	Djelovanje ABO-izohemaglutinina	11
2.2.	ABH-antigeni	13
2.2.1.	ABH-krvno grupni antigeni	13
2.2.1.1.	Eritrocitni ABH-antigeni	13
2.2.1.2.	Biokemijska osnova ABH-antigena	16
2.2.1.3.	Molekularna genetika ABH-antigena	19
2.2.1.4.	Nasljeđivanje sustava krvnih grupa ABO	21
2.2.1.5.	Raspodjela ABO-sustava i evolucijski pokazatelji	22
2.2.1.6.	Trombocitni ABH-antigeni	25
2.2.1.7.	ABH-antigeni u tkivnim tekućinama	27
2.3.	ABH-tkivno grupni antigeni	27
2.4.	ABO-izohemaglutinini u transfuzijskoj medicini	28
2.4.1.	ABO-izohemaglutinini i transfuzija koncentrata eritrocita	29
2.4.2.	ABO-izohemaglutinini i transfuzija koncentrata trombocita	30
2.5.	ABO-izohemaglutinini u transplantacijskoj medicini	36
2.5.1.	ABO-izohemaglutinini i transplantacija solidnih organa	38
2.5.1.1.	Transplantacija bubrega	39
2.5.1.2.	Transplantacija srca	42
2.5.1.3.	Transplantacija jetre	43
2.5.2.	Transplantacija krvotvornih matičnih stanica	43
2.6.	Ispitivanje titra ABO-izohemaglutinina	46
3.	MATERIJALI I METODE	47
3.1.	Ispitanici	47
3.2.	Metode	49

3.2.1.	Određivanje razine ABO-izohemaglutinina	49
3.2.2.	Analiza križne reaktivnosti ABO-izohemaglutinina i alergena	51
3.3.	Statistička analiza	55
3.3.1.	Analiza razine ABO-izohemaglutinina prema kategorijama spol, dob, krvne grupe i godišnja dob	55
3.3.2.	Analiza križne reaktivnosti ABO-izohemaglutinina i grupnih alergena	55
4.	REZULTATI	56
4.1.	Karakteristike ABO-izohemaglutinina kod DDK prema krvnim grupama	56
4.1.1.	Usporedba razine ABO-izohemaglutinina između krvnih grupa A i B	56
4.1.2.	Usporedba razine ABO-izohemaglutinina između krvnih grupa O i A i krvnih grupa O i B	57
4.1.3.	Usporedba razine Anti-A i Anti-B izohemaglutinina kod krvne grupe O	58
4.1.4.	Usporedba imunoglobulinskih razreda kod krvne grupe O	59
4.1.5.	Usporedba imunoglobulinskih razreda kod krvne grupe A	59
4.1.6.	Usporedba imunoglobulinskih razreda kod krvne grupe B	60
4.1.7.	Korelacijska usporedba imunoglobulinskih razreda ABO-izohemaglutinina unutar krvnih grupa	61
4.2.	Karakteristike ABO-izohemaglutinina kod DDK prema spolu i krvnim grupama	63
4.2.1.	Usporedba razine ABO-izohemaglutinina prema spolu kod DDK krvne grupe O	63
4.2.2.	Usporedba razine ABO-izohemaglutinina prema spolu kod DDK krvne grupe A	63
4.2.3.	Usporedba razine ABO-izohemaglutinina prema spolu kod DDK krvne grupe B	64
4.3.	Usporedba razine ABO-izohemaglutinina kod trudnica	65
4.4.	Karakteristike ABO-izohemaglutinina kod DDK prema dobnim skupinama	67

4.5.	Karakteristike ABO-izohemaglutinina kod DDK prema dobinim skupinama i spolu	68
4.6.	Karakteristike ABO-izohemaglutinina kod DDK prema godišnjim dobima	71
4.7.	Rezultati analize križne reaktivnosti ABO-izohemaglutinina IgM- i IgG- ABO-izohemaglutinina s grupnim alergenima trava (mješavina 1 i 2), korova (mješavina 3) i stabala (mješavina 4)	72
5.	RASPRAVA	73
6.	ZAKLJUČCI	82
7.	LITERATURA	84
8.	ŽIVOTOPIS	90

1. UVOD

Klinička važnost svih sustava eritrocitnih antigena određena je biološkom aktivnošću antitijela na eritrocitne antigene iz tih sustava. To posebno vrijedi za sustav krvnih grupa ABO. ABO-izohemaglutinini usko su vezani uz oligosaharidne ABH-antigene i zajedno čine nedjeljivu cjelinu, što ih čini dijelom tog sustava. U tom kontekstu, biološki efekti ABO-izohemaglutinina važni su u transfuzijskoj medicini.

Osim na eritrocitnim membranama, ABH-antigeni prisutni su na stanicama raznih tkiv i organa. Zajedno s HLA-antigenima čine skupinu tkivno grupnih antigena te su stoga biološki efekti ABO-izohemaglutinina važni i u transplantacijskoj medicini.

ABO-izohemaglutinini čine imunološku barijeru antigenima kod nepodudarnih transfuzija i transplantacija organa, što može ugroziti sigurnost transfuzijske terapije i ishod transplantacija. Imunološka barijera rezultat je stalne prisutnosti ABO-izohemaglutinina u krvi, njihovih snažnih izvršnih mehanizama te prisutnosti ABH-antigena na stanicama endodermnog, mezodermnog i ektodermnog podrijetla.

Iako se o ABH-antigenima mnogo zna, već stotinjak godina od kada je otkriven sustav krvnih grupa ABO, etiologija ABH-antigena još uvijek je nejasna. Stvarni biološki razlozi za razvoj i fenotipske različitosti antigena iz sustava krvnih grupa ABO i dalje su nejasni.

To isto vrijedi i za ABO-izohemaglutinine. Karakterizira ih raznovrsnost specifičnosti, imunoglobulinskih razreda i neujednačenih koncentracija u serumu, koje se povezuju s demografskim obilježjima, etnografskim podrijetlom te indirektno s čimbenicima okoline, kao što su, izloženost mikroorganizmima, alergenima te prehrambenim navikama pojedinca. Hiperimunizacijski događaji, poput transfuzije, trudnoće ili cijepljenja također utječu na njihovu pojavnost. Njihovo podrijetlo još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno.

U transfuzijskoj i transplantacijskoj medicini važan je jasan pristup kojim se biološki učinci ABO-izohemaglutinina i njihovi negativni ishodi svode na najmanju razinu. U regulacijskom smislu ne postoje jednoznačne smjernice o postupanjima te su pristupi različiti. Razvijeniji zdravstveni sustavi kao dio strategije uključuju prospektivno pretraživanje reaktivnosti ABO-izohemaglutinina u davatelja i primatelja krvnih pripravaka i organa.

Za ispitivanje razine ABO-izohemaglutinina primjenjuju se različite metode i pristupi. Kvantifikacija reaktivnosti specifičnih ABO-krvno grupnih antitijela jedna je od najtežih za standardizaciju.

Ne postoji univerzalno prihvaćena metoda. Rezultati variraju, a zbog čestih unutar i međulaboratorijskih razlika, teško su usporedivi.

Doprinos

Određivanjem razine imunoglobulinskih razreda ABO-izohemaglutinina u populaciji dobrovoljnih davatelja krvi, koji prema svojim karakteristikama predstavljaju zdravu populaciju u RH, po prvi puta bi se dobila jasna slika o njihovom statusu te potvrdile pretpostavke o utjecaju obilježja spola, dobi i krvnih grupa na razinu pojedinih imunoglobulinskih razreda.

Ispitivanjem križne reaktivnosti ABO-izohemaglutinina i respiratornih alergena, odnosno povezanosti koncentracije alergena trava, korova i stabala na pojavnost i razinu ABO-izohemaglutinina, pojasnila bi se moguća etiologija ABO-izohemaglutinina. Njihovo podrijetlo još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno. Prema dosadašnjim saznanjima ne postoje istraživanja u tom smjeru.

Ciljevi

1. Utvrditi prosječnu razinu ABO-izohemaglutinina kod zdrave populacije u Republici Hrvatskoj metodom mikroaglutinacije u gel kolonama.
2. Odrediti razlike u razini ABO-izohemaglutinina u odnosu na spol, dob, krvne grupe i godišnja doba kod zdrave populacije u Republici Hrvatskoj.
3. Ispitati križnu reaktivnost ABO-izohemaglutinina s uobičajenim respiratornim alergenima enzimimunološkom metodom.

Metode

1. U svrhu određivanja razine ABO-izohemaglutinina odabrana je metoda mikroaglutinacije u gel kolonama. Temelji se na dodavanju optimalnih količina eritrocitne suspenzije i plazme u reakciju u mikrokolone. Vizualna detekcija i ocjena reakcije vezivanja ABH-antigena i specifičnih izohemaglutinina omogućena je nakon inkubacije na različitim temperaturnim rasponima i vremenskim intervalima. Oni ovise o ispitivanom imunoglobulinskom razredu.

2. U svrhu ispitivanja križne reaktivnosti ABO-izohemaglutinina i respiratornih alergena kreiran je i optimiziran nekomercijalni (*in house*) imunoenzimski test ELISA (od engl. *enzyme linked immunosorbent assay*). Metodologija uključuje vezanje

pročišćenih alergenskih ekstrakata na mikrotitarske pločice u karbonatnom puferu te dodavanje u reakciju eluiranih ABO-izohemaglutinina. Spektometrijska detekcija prisutnih ABO-izohemaglutinina specifičnih za alergen omogućena je vezanjem specifičnih antitijela konjugiranih s enzimom peroksidazom iz hrena HRP (od. engl. *horse radish peroxidase*) za Fc-krajeve IgM ili IgG ABO-izohemaglutinina te nastanka enzimskog produkta nakon reakcije s pojačivačima i tetrametilbenzidin supstratom (TMB).

Hipoteza

Određivanje razine i razreda ABO-izohemaglutinina metodom mikroaglutinacije u gel kolonama doprinijela bi pouzdanom i brzom određivanju razine ABO-izohemaglutinina u krvi dobrovoljnih davatelja krvi i bolesnika u rješavanju složenih situacija u terapijskim postupcima.

Ispitivanje križne reaktivnosti ABO-izohemaglutinina s uobičajenim respiratornim alergenima doprinijelo bi razjašnjavanju nejasne etiologije.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. ABO-izohemaglutinini

2.1.1 Definicija izohemaglutinina

Izohemaglutinini (IH) su izoantitijela. Prefiks *izo* je izvedenica iz grčke riječi *ίσος* (*isos*) = isti ili jednak, što je povezano s načinom nastanka izoantitijela. Ona nastaju zbog imunog odgovora određene jedinice na antigen koji je svojstven za drugu jedinku iz iste vrste. Te antigene još nazivamo i izoantigenima. Kod ljudi postoji znatan broj izoantigena, a najbolji primjer za to su krvno grupni antigeni kao i tkivno grupni antigeni. Izohemaglutinini su antitijela na antigene iz sustava krvnih grupa ABO (1).

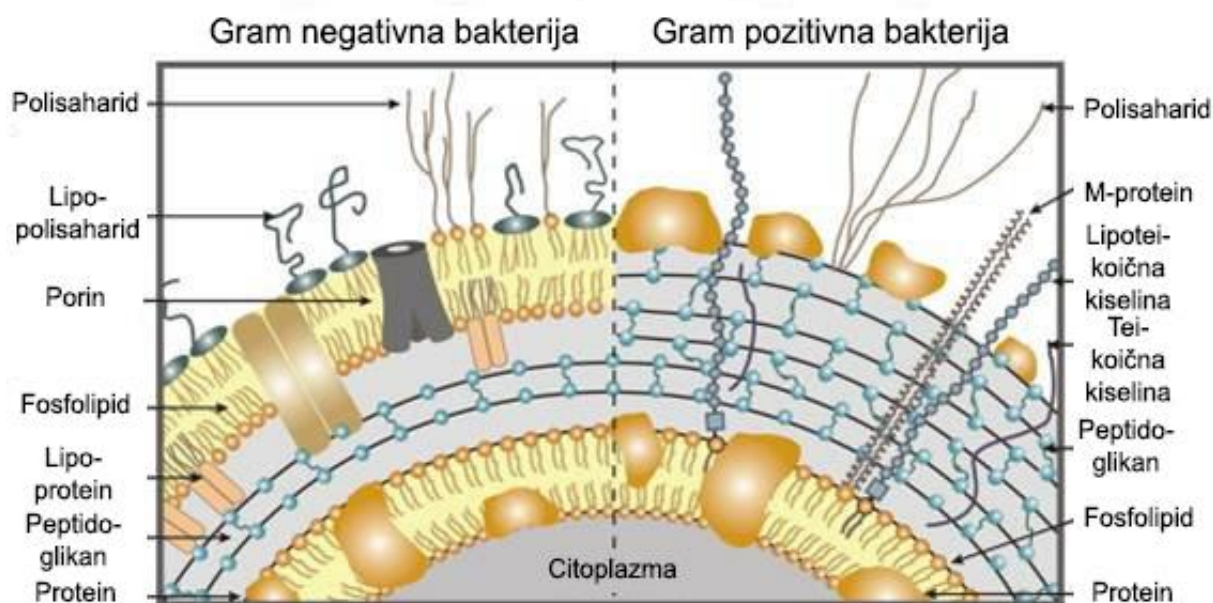
2.1.2. Nastanak ABO-izohemaglutinina

Nastanak ABO-izohemaglutinina ne prati u potpunosti definiciju nastanka izoantitijela, jer oni ne nastaju nužno kao imunosni odgovor na izlaganje antigenima druge osobe. Podrijetlo im još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno. Postoji nekoliko teza o nastanku ABO-izohemaglutinina. Landsteiner je vjerovao da ABO-izohemaglutinini nastaju spontano (1).

Genetsku hipotezu zagovarali su Furuhashi i Hirsfeld prema kojoj se ta antitijela nasljeđuju parom povezanih gena, od kojih je jedan odgovoran za krvno grupni antigen, a drugi za komplementarno antitijelo koje nastaje neovisno o izlaganju imunološkog sustava vanjskim križno reaktivnim ili homogenim antigenima (2).

Dupont je još tridesetih godina prošlog stoljeća smatrao da su ABO-izohemaglutinini vjerojatno rezultat imunosnog odgovora na široko rasprostranjene antigene iz okoline, koji posjeduju krvno grupnu antigeničnost identičnu sa strukturama krvnih grupa ABO na ljudskim stanicama. Schiff je 1934. godine dokazao krvno grupnu aktivnost bakterije *Shigella shigae*. Springer i suradnici, šezdesetih godina, dali su veliki doprinos potvrdi imunogenetske hipoteze. ABO-izohemaglutinini prema Springeru nastaju nakon antigene stimulacije. Najčešće se radi o bakterijama koje su ušle u organizam kroz gastrointestinalni i respiratorni trakt (3-6). Često se na površini mikroorganizama nalaze terminalni šećeri L-fukoza, N-acetil-D glukozamin, D-manoza, odnosno PAMP-strukture (od engl. *pathogen associated molecular patterns*). Te strukture predstavljaju ciljne točke izvršnih mehanizama urođene imunosti (Slika 1) (7).

Bakterijska ovojnica



Slika 1. Bakterijska stijenka (Preuzeto i prilagođeno: Nikaido H. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67)

Na primjer, *Escherichia coli* O₈₆ posjeduje visoku krvno grupnu aktivnost, prije svega krvne grupe B i nešto manje krvne grupe A (3, 4).

Kod 50% od 282 aerobnih Gram-negativnih bakterija, izoliranih u bolesnika, utvrđena je krvno grupna aktivnost. Te su bakterije dio crijevnog ekosustava u kojem bivaju razgrađene enzimima glikozidazama koji se pojavljuju u prvim mjesecima života. Pretpostavlja se da bi ta razgradnja mogla dovesti do sićušnih i neprestanih inokulacija krvno grupnih antigena i odgovora imunološkog sustava proizvodnjom ABO-izohemaglutinina. Kod tih bakterija je dokazana prisutnost specifičnih monosaharida sličnih krvno grupnim antigenima ABH. Kod 50% bakterija kod kojih aktivnost nije dokazana, najvjerojatnije se radi o enantiotrofnim izomerima (zrcalna struktura) zbog kojih su nedostupni izohemaglutininima u inhibicijskom testu hemaglutinacije, koji je korišten u tu svrhu (3-5).

Francuska studija je pokazala da je razina ABO-izohemaglutinina za 50% bila veća u djece sredinom dvadesetog stoljeća, nego pedeset godina ranije. To se objašnjava profilaktičkim vakcinacijama djece bakterijskim cjepivima i posljedičnom inokulacijom križno reaktivnih antigenih struktura. To se prije svega odnosi na cjepivo protiv tetanusa, parotitisa i difterije. Kod meningokoknog cjepiva te cjepiva protiv *Hemofilusa influenzae B*, kao i cjepiva protiv virusa influenzae A i B, pronađena je tvar slična krvnoj grupi A. Krvno grupna supstanca A prisutna je i u pneumokoknom cjepivu (8-11, 16).

U Japanu se pak razina ABO-izohemaglutinina snizila u periodu od petnaest godina (1986-2001). Objašnjenje leži u tome, da u usporedbi s drugim dalekoistočnim narodima, Japanci jedu puno više obrađene nego svježe hrane (22).

Daniel-Johnson i sur. su dokazali da režim prehrane može utjecati na razinu ABO-izohemaglutinina. Nakon stimulacije s probiotičkim proizvodima koji sadrže laktobacil i bifidobakteriju, titar kod dobrovoljnih davatelja krvi bio je vrlo visok. Probiotike čini velika skupina mikroorganizama koja ima pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Osnova za korištenje probiotika temelji se na izravnom ili neizravnom utjecaju na imunski sustav. Izravni učinci uključuju promjene u crijevnoj mikroflori i promjenama na PAMP-strukturama crijevnih mikroorganizama te posljedično bolju prezentaciju limfnom tkivu u sklopu gastrointestinalnog trakta (GALT; od engl. *gut-associated lymphoid tissue*).

Neizravni učinci su komunikacija s mnogim tipovima stanica što dovodi do pojačavanja fizičkih i kemijskih barijera (14).

Perez i sur. smatraju da je razina izohemaglutinina veća kod djece nižeg socijalnog statusa koja žive u slabijim higijenskim uvjetima i okruženju zasićenom raznim mikroorganizmima (13).

U prilog Dupontovoj tezi govori i podatak da kod zdravih jednojajčanih blizanaca i trojki postoje značajne razlike u titru ABO-izohemaglutinina, 75% za anti-A i čak do 90% za anti-B izohemaglutinine (4).

Grundbacher je 1976. godina ustanovio da postoji razlika u titru ABO-izohemaglutinina između bijele i crne rase. Međutim, kasnije se pokazalo da rasa nije čimbenik koji čini razliku u titrovima, već je to okolina. Najnovija studija rađena u Velikoj Britaniji nije dokazala značajnu razliku između dobrovoljnih davatelja krvi (DDK) bijele, crne i žute rase (29).

Dakle, socioekonomski uvjeti i životni stilovi te čimbenici iz okoline koji su u uskoj vezi s etnografskim podrijetlom utječu na dinamiku ABO-izohemaglutinina (22).

Strukture slične ABH-antigenima prisutne su i na drugim strukturama iz okoline, peludi trava, korova, drveća te prašini. Vanjske ovojnice peludnih alergena su polisaharidne strukture i pretpostavlja se da su slične strukturi ABO-krvnih grupa. Springer je u svojim ispitivanjima pokazao da strukture grančica golosjemenjača ili četinjača i strukture kritosjemenjača ili cvjetnjača imaju sposobnost inhibicije hemaglutinacije s homolognim antiserumima te da dijele sličnost s krvno grupnim mukoidnim strukturama (4, 5).

Uobičajeno je mišljenje da su ABO-izohemaglutinini prisutni u cirkulaciji od trećeg ili četvrtog mjeseca pa do kraja života. Studije prije i poslije Springerovih ispitivanja dokazale su postojanje ABO-izohemaglutinina kod novorođenčadi, a koji nisu majčinog podrijetla i ne mogu se objasniti samo tezom da su dio stečenog imunskog sustava, jer imunski sustav tada

još uvijek nije razvijen, kao što nisu razvijeni niti razgradivi krvno grupni enzimi koji se u stolici djeteta pojavljuju tek nakon nekoliko mjeseci (1, 3).

Još uvijek nije determinirano je li stalna prisutnost ABO-izohemaglutinina IgM razreda rezultat permanentnih stimulacija koje neprekidno regrutiraju nove klonove B stanica ili je rezultat stalne proizvodnje istog dugoživućeg klona (1).

Etiologija i dalje ostaje nejasna. Djelovanjem različitih podtipova B-limfocita, B1-(CD5+) limfocita, B2-(CD5-) limfocita marginalne zone i B2-(CD5-) folikularnih limfocita odgovornih za proizvodnju antitijela ovisnih o T-limfocitima u sklopu stečene imunosti, pitanje nastanka ABO-izohemaglutinina postaje još zanimljivije.

Wuttke i suradnici utvrdili su da B1-(CD 5+) limfociti prevladavaju u novorođenčadi te da su specijalizirani za proizvodnju tzv. „emergency“ antitijela razreda IgM protiv bakterijskih antigena, PAMP-struktura, koja su križno reaktivna s ABH-eritrocitnim ugljikohidratnim antigenima. Pretpostavlja se da nastaju neovisno o antigenoj stimulaciji, budući su prisutna od rođenja (18). Javljaju se tijekom ontogeneze, a struktura antitijela je ugrađena u genom zametne loze. Fenotipskom analizom pokazano je da osmomjesečno dijete ima povišen udio B-stanica koje na svojoj površini ekspimiraju CD5-antigen (52%). Udio CD 5+ B-limfocita u odraslih je manji, iznosi 19% te prevladavaju u peritoneumu i sluznicama (17-19).

B1-limfociti nastaju u fetalnoj jetri, imaju sposobnost samoobnove i u najvećoj mjeri proizvode antitijela već u vrlo ranoj dobi. Ova antitijela ograničene su raznolikosti, niskog afiniteta, IgM-razreda. Geni za ta antitijela ekspimiraju relativno ograničen repertoar V-gena te ekspimiraju slabiju tzv. „junction“ raznolikost u odnosu na konvencionalna antitijela. To je zato što enzim terminalne deoksinukleotidne transferaze (TdT), koji je važan za dodavanje N-nukleotida na dijelovima genoma nakon odstranjivanja pojedinih sekvenci, nije ekspimiran u fetalnoj jetri (7, 20, 21).

Rieben i sur. pokazali su da su kod IgM-razreda ABO-izohemaglutinina prisutni identični poliklonalni serotipski motivi (N=20), što su objasnili odsustvom somatske mutacije, koja je karakteristična za B2-folikularne limfocite koji nakon antigene stimulacije dodatno afinitetno sazrijevaju (28).

B1-limfociti ne surađuju s T-limfocitima jer su polisaharidni antigeni na koje su prvenstveno usmjereni, antigeni neovisni o T-limfocitima. Ne izazivaju imunsku memoriju i kod njih se ne događa zamjena imunoglobulinskih razreda tzv. „class switching“ te su isključivo IgM-razreda. Odgovaraju na slične antigene obrasce koji se obično nalaze u sučelju epitela i vanjskog okruženja (gastrointestinalni i respiratorni sustav).

Osim B1-limfocita, B2-limfociti iz marginalnih zona limfnih čvorova i slezene također proizvode antitijela istih karakteristika.

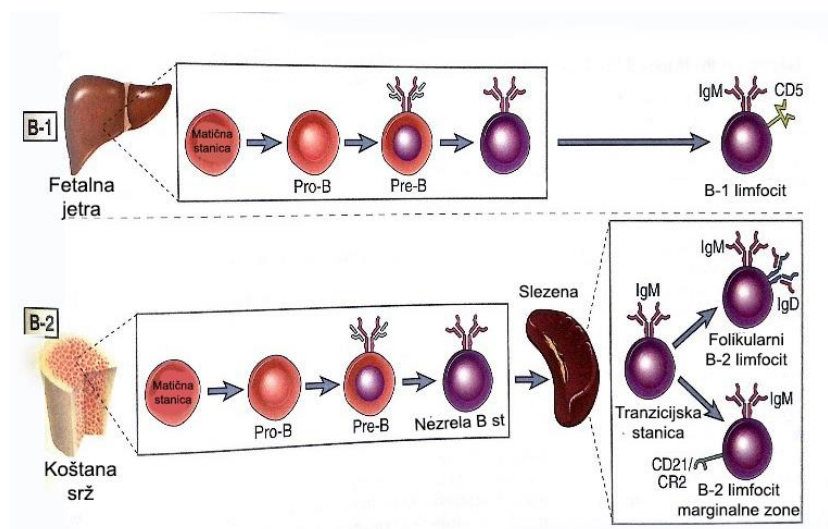
B2-(CD5-) folikularni limfociti su pak odgovorni za proizvodnju antitijela ovisnih o T-limfocitima. Bez njihove pomoći ne dolazi do sinteze IgG-razreda antitijela i somatske mutacije što ih čini kompetentnim u odgovoru na strukturno i stehiometrijski složenije antigene, kao što su proteini (Tablica 1, Slika 2) (7, 21).

Wuttke i sur. su modificiranim hemolitičkim testom plaka dokazali da i B1- i B2- limfociti sudjeluju u odgovoru na krvno grupnu supstancu što objašnjava prisustvo oba razreda ABO-izohemaglutinina, prije svega kod krvne grupe O (18).

Tablica 1. Karakteristike B-limfocita CD5+ i CD5-

	Imunološki odgovor	B limfocit	Djelovanje	Razred	Ovisnost o T limf.	Antigena stimulacija	Geni zametne loze
Prirodna antitijela	<i>Urođena imunost</i>	<i>B1 (CD5+)</i>	<i>lokalno</i>	<i>IgM>>IgG (nema IgA, IgE i IgD)</i>	<i>NE</i>	<i>Nije potrebna</i>	<i>Ograničeni</i>
Imuna antitijela	<i>Stečena imunost</i>	<i>B2 (CD5-)</i>	<i>sistemska</i>	<i>IgG>IgM>IgA,IgE,IgD</i>	<i>DA</i>	<i>Potrebna</i>	<i>Preslagivanje Hipermutacija</i>

Preuzeto i prilagođeno: Branch DR (2015) Transfusion 55 Suppl 2: 74-9.



Slika 2. Razvoj B1- i B2- limfocita (Preuzeto i prilagođeno: A.K. Abbas Cellular and Molecular Immunology)

Kako bismo ABO-izohemaglutinine jednostavnije razlikovali od ostalih eritrocitnih aloantitijela, jer eritrocitna membrana sadrži više stotina krvno grupnih antigena, svejedno ih kolokvijalno nazivamo „prirodnim antitijelima“, iako to barem jednim dijelom nisu. Taj su naziv, prije svega, dobili jer se za njih ne može utvrditi trenutak očitog kontakta s antigenom i njihova prisutnost u vrlo ranoj dobi života.

ABO-izohemaglutinini se kod ljudi javljaju prema Landsteinerovom zakonu. Taj zakon bez izuzetka vrijedi za sve krvne grupe. Osobe koje ne posjeduju bilo koji od antigena iz sustava ABO uvijek će razviti odgovarajuća antitijela odnosno ABO-izohemaglutinine. Tako, osobe krvne grupe A razvijaju anti-B antitijela, jer im je supstanca iz okoline koja je po strukturi slična B-antigenu, nepoznata. Isto načelo vrijedi i za osobe krvne grupe B, odnosno za osobe krvne grupe O, čiji imunološki sustav odgovara proizvodnjom anti-A i anti-B antitijela, jer su im oba antigena strana. Kod osoba krvne grupe O mogu se dokazati i antitijela anti -A/B. Čini se da to antitijelo prepoznaje zajedničke dijelove A- i B- antigena (Tablica 2). Prvi ih je dokazao Dodd 1952. godine adsorpcijsko-elucijskom studijom. Osobe krvne grupe AB prema toj analogiji ne razvijaju izohemaglutinine (1, 26).

Tablica 2. Pojavnost ABO-izohemaglutinina prema Landsteinerovom zakonu

Krvna grupa	Antigen(i) na eritrocitnoj membrani	Antitijela u serumu
A	A	<i>Anti-B</i>
B	B	<i>Anti-A</i>
AB	A i B	<i>nisu prisutna</i>
O	<i>nisu prisutni</i>	<i>Anti-A i Anti-B</i> <i>Anti A/B</i>

2.1.3. Građa ABO-izohemaglutinina

Poznato je da se ABO-izohemaglutinini pojavljuju kao imunoglobulinski razredi IgM, IgG i IgA. Kombinacijom kromatografije i ultracentrifugiranja ustanovljena su dva tipa molekula ABO-izohemaglutinina, jedan s koeficijentom sedimentacije S7 svojstven razredu IgG, koji je monomerna molekula (150 000 Da) i drugi s koeficijentom sedimentacije S19 koje karakterizira razred antitijela IgM koji je pentamerna molekula (900 000 Da) (3).

U serumu, kao i u majčinom mlijeku i sekretima, može se naći i razred izohemaglutinina IgA. Međutim, uloga im je nejasna u imunohematološkim reakcijama i do sada nije utvrđeno njihovo kliničko značenje. Općenito, razred IgA-izohemaglutinina često nastaje tijekom aloimunizacije kao pratitelji izohemaglutinina razreda IgG. IgA-razred izohemaglutinina samo iznimno djeluju u razgradnji stanica jer za njih ne postoje receptori na slezenskim i jetrenim makrofagima, a komplement aktiviraju samo alternativnim putem (24, 25, 68).

Heterogenost razreda ABO-izohemaglutinina uočena je kod različitog ABO statusa. IgM-razred je predominantan kod A- i B- krvnih grupa dok je IgG-razred kod tih krvnih grupa vrlo rijetko izražen u visokom titru. Suprotno, krvna grupa O u značajnoj mjeri posjeduje IgG-razred ABO-izohemaglutinina. Moguće objašnjenje dali su Kay i Locke, koji smatraju da osobe krvne grupe O proizvode IgG-antitijela češće od ostalih zbog veće antigene različitosti između krvne grupe O i krvnih grupa A ili B, nego što je to različitosti između krvne grupe A i krvne grupe B, što dovodi do zamjene imunoglobulinskih razreda, tzv. „class swiching“ i proizvodnje IgG-razreda antitijela. Storry i Olsson smatraju da IgG-antitijela mogu nastati tek nakon hiperimunizacijskog događaja, trudnoće ili transfuzije. Metodom protočne citometrije za izdvajanje stanica ABO-FACS (od engl. *ABO fluorescence-activated cell sorting*), Stussi i sur. uspjeli su odrediti pojedine razrede ABO-izohemaglutinina unutar pojedinih krvnih grupa. IgG-razred ABO-izohemaglutinina utvrđen je u 89% osoba s krvnom grupom O, dok je kod krvne grupe A i kod krvne grupe B taj razred zastupljen u puno manjoj mjeri s 4% i 14% (25).

Prema Riebenu i sur. najviše su zastupljeni podrazredi IgG1 i IgG2 čija zastupljenost varira od osobe do osobe (23, 28), a prema Storry i Olsson to su IgG2- i IgG4- podrazredi (35).

Brouwers je dokazao da je IgG2-podrazred najčešći i da se često javlja u kombinaciji s drugim podrazredima, kao što su IgG1 + IgG3, IgG1 + IgG4 te u kombinaciji sa svim podrazredima (29).

2.1.4. Djelovanje ABO-izohemaglutinina

Važnost ABO-izohemaglutinina je u tome što predstavljaju snažnu imunološku barijeru antigenima kod ABO nepodudarnih transfuzija i transplantacija organa. Imunološka barijera je rezultat nekoliko čimbenika. Stalna prisutnost ABO-izohemaglutinina u krvi, koja je rezultat ranog i trajnog kontakta s izoantigenima iz okoline ili je dio uređene imunosti, omogućuje njihovo promptno djelovanje. U kontaktu s antigenom nije potrebno prolaziti latentnu ili „lag“ fazu karakterističnu za primarni odgovor, u kojoj se imunološki sustav upoznaje s antigenom. Izvršne mehanizme određuju imunoglobulinski razredi te kvantitativna i kvalitativna prisutnost ABH-antigena na stanicama endodermnog, mezodermnog te ektodermnog podrijetla. Izvršni mehanizmi plod su djelovanja konstantne regije teškog lanca, uključuju mnoge mehanizme te zahtijevaju sudjelovanje različitih staničnih i humoralnih komponenti imunološkog sustava, uključujući fagocitne stanice i sustav komplementa.

Djelovanje IgM-razreda najčešće se iskazuje preko imunološke reakcije tipa-II, odnosno aktivacije komplementa (Slika 3A). Vezanje antitijela na multivalentne antigene kao što su polisaharidi na površini stanica dovodi do grupiranja Fc-regija antitijela, promjene u konfiguraciji što dovodi do oslobađanja C_{H2}- i C_{H3}- domena na antitijelima IgG i IgM, što je preduvjet za aktivaciju C1q-komponente komplementa. Pentamerna građa IgM-razreda olakšava proces vezivanja i aktivacije C1q- komponente komplementa. Podrazredi IgG1 i IgG3 bolje aktiviraju komplement od ostalih IgG-podrazreda.

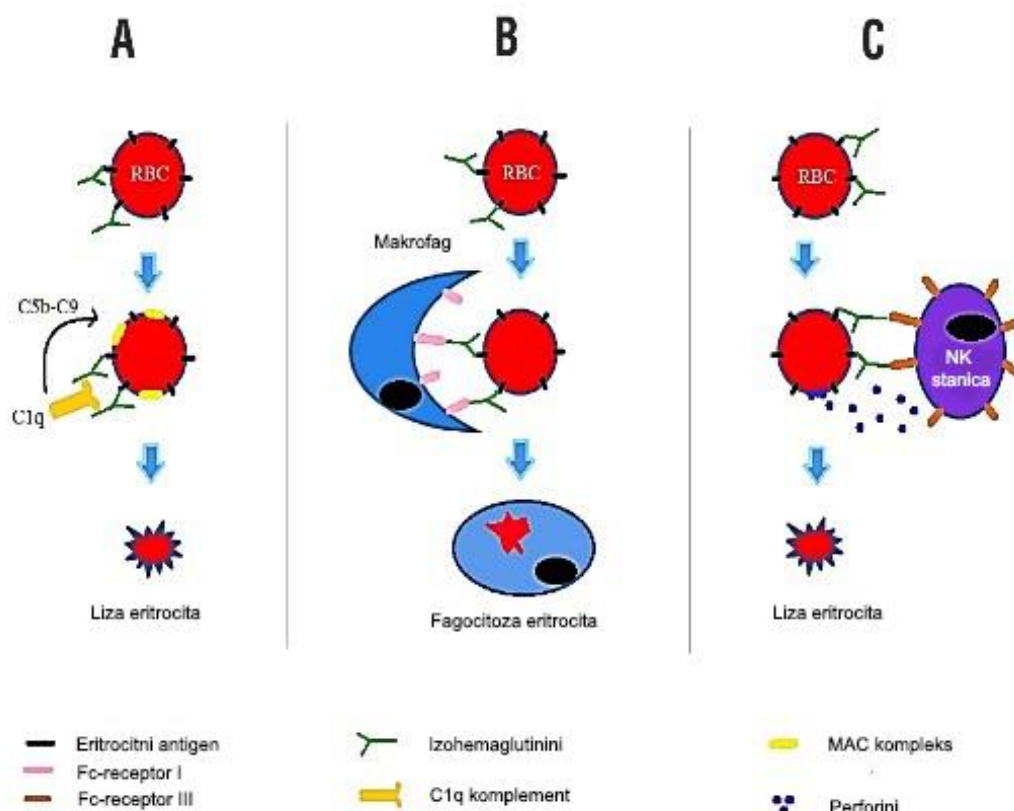
Sve biološke funkcije komplementa ovisne su o proteolitičkom cijepanju C3-komponente. C3b-komponenta kovalentno se veže na receptore C3b, na neutrofilima i makrofagima, a sudjeluje i u kompleksu C5-konvertaze, koja preko komponente C5a pokreće upalne procese, a preko komponente 5b aktivira komplement do kompleksa MAC (od engl. *membrane attack complex*). Drugi izvršni mehanizam je fagocitoza antitijelima obloženih stanica (Slika 3B).

Receptori za imunoglobulinske teške lance različitih izotipova (Fc-fragment) nalaze se na populaciji leukocita i imaju različite funkcije. Jedan od najvažnijih receptora za fagocitozu obloženih antigena su receptori za teški lanac antitijela IgG razreda, Fcγ- receptori. Klasificirani su u tri grupe, Fcγ IR, Fcγ IIR i Fcγ IIIR, ovisno o afinitetu za teške lance različitih IgG-podrazreda. Međusobno se razlikuju u ekstracelularnoj dužini α lanca (CD64, CD32, CD16) koji se nalazi u kompleksu s Fcγ-receptorom.

FcγIR(CD64) je najveći Fcγ-receptor. Nalazi se na makrofagima i neutrofilima te s visokim afinitetom veže IgG1- i IgG3- podrazred IgG-antitijela. Transkripciju za taj receptor stimulira

interferon- γ (INF- γ), kao što stimulira i zamjenu imunoglobulinskih razreda, tzv. „class switchig“ za IgG1 i IgG3.

NK-stanice preko svojih receptora, najviše Fc γ III(CD16) i manje Fc γ IICR(CD32), vežu se na stanice obložene antitijelima i pokreću ADCC-mehanizam (od engl. *antibody dependet cell mediated citotoxicity*). Aktivacija NK-stanica posredovana IgG-imunoglobulinskim razredom očituje se povećanjem sekrecije citokina i oslobađanjem sadržaja iz granula, što dovodi do lize stanica (Slika 3C) (7).



Slika 3. Izvršni mehanizmi izohemaglutinina

(Preuzeto i prilagođeno: <http://www.hypothesisjournal.com/wp-content>)

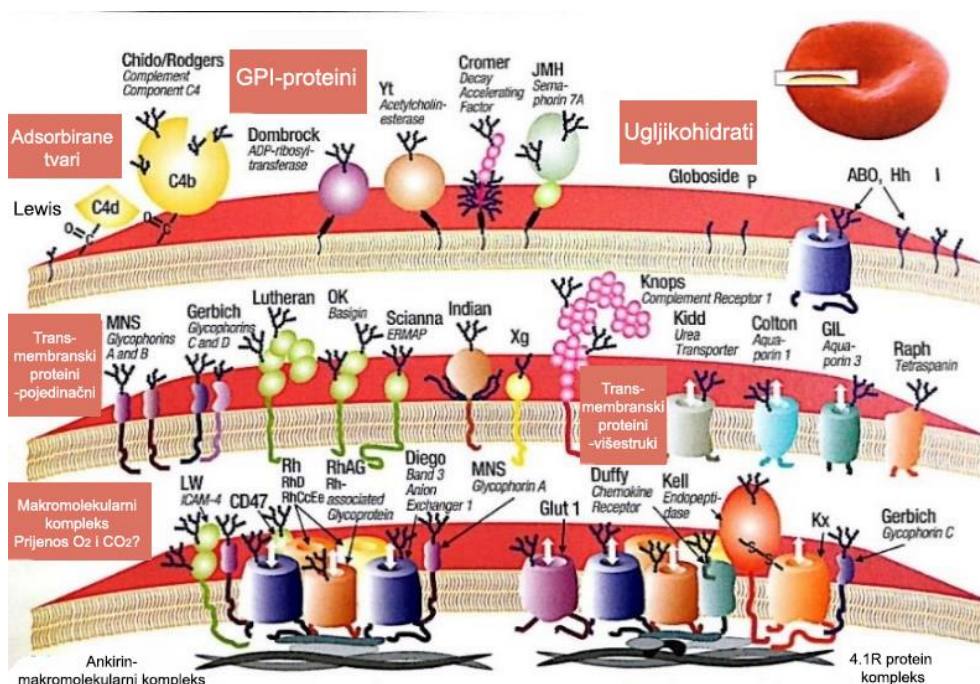
2.2 ABH-ANTIGENI

2.2.1. Krvno grupni antigeni

2.2.1.1. Eritrocitni ABH-antigeni

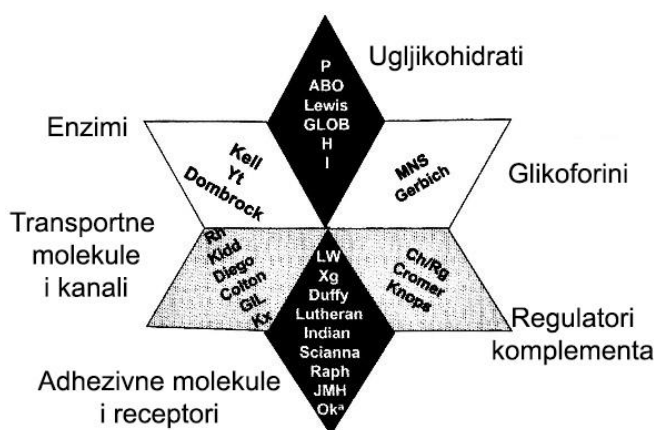
Eritrocitni antigeni su integralni dijelovi eritrocitne membrane i submembranskih struktura. Do danas je otkriveno više od 600 eritrocitnih antigena. Neki od njih svrstani su u sustave krvnih grupa koji su klasificirani prema nomenklaturi International Society of Blood Transfusion (ISBT).

Pod terminom „sustav krvnih grupa“ moglo bi se pretpostaviti da se termin odnosi na sve antigene strukture koje se nalaze u krvi. Međutim, to je termin kojim se označavaju isključivo antigeni na eritrocitnoj membrani, a preduvjet za označavanje nekog membranskog antigena krvnom grupom je precizno definirana biokemijska struktura, smještaj na membrani eritrocita, način nasljeđivanja i dokaz postojanja odgovarajućeg specifičnog antitijela (29).



Slika 4. Antigeni na eritrocitnoj membrani (Preuzeto i prilagođeno: ISBT - Manual 2010)

Eritrocitni antigeni su na membrani izloženi kao ugljikohidrati ili proteini koji su vezani na samu površinu membrane ili su integrirani u lipidni dvosloj membrane. Imaju razne uloge važne za strukturu i život stanice (Slika 5). Postoji približna ovisnost između kemijske strukture antigena i njihovog biološkog značenja. Krvne grupe u kojima imunodominantni šećeri određuju specifičnost antigena (A, B, H, P, Le, GLOBO, I, FORS) nisu, čini se, vitalne za život eritrocita. Nasuprot njima, o proteinskim antigenima ovise oblik, funkcija i život eritrocita. Neki su transportni proteini za razne supstancije (Di, Co, Jk, Rh), drugi sudjeluju u adheziji stanica za limfocite (In- CD 44, Lu i LW- ICAM-4, Ok^a), neki reguliraju aktivaciju komplementa (Ch/Rg-C4, Cromer, Knopps-CR1), a neki su receptori za citokine IL-8 (Fy). Biološke funkcije nekih krvnih grupa nisu poznate (MNS), (Slika 5) (27, 29).



Slika 5. Biološko značenja pojedinih krvnih grupa (Preuzeto i prilagođeno: Storry JR. Immunohematology 2004, Vol. 20(4):206-214)

Sustav krvnih grupa ABO je u kliničkom smislu, zbog izloženosti ABH-antigena i stalne prisutnosti ABO-izohemaglutina, najvažniji sustav eritrocitnih krvnih grupa. Prvi je otkriven, a njegova nomenklatura se nije mijenjala. Kako je to prvi otkriveni sustav, dodijeljen mu je broj 001 u terminologiji International Society of Blood Transfusion (ISBT). Sustav čine A-, B- i H-antigeni i pripadajuća antitijela (29, 35).

ABH-antigeni se počinju razvijati već u 5. ili 6. tjednu gestacijske dobi i još nisu u cijelosti razvijeni nakon rođenja. U dobi od 2. do 4. godine u potpunosti su razvijeni kao i potpuna razgranatost prekursorskih lanaca, kao preduvjet tome. Ostaju tijekom cijelog života (29). Ne nalaze se samo na eritrocitima, gdje su najviše zastupljeni, već se nalaze i na stanicama

endodermnog (većina organa gastrointestinalnog trakta, respiratornog sustava), mezodermnog (krvne stanice, krvne žile, vezivno tkivo, mišići) te ektodermnog podrijetla (koža, neuroni, žlijezde slinovnice). Svaki eritrocit na sebi nosi od $0,3$ do 2×10^6 ABH-antigenih struktura (2, 30).

Usprkos njihovoj neupitnoj kliničkoj važnosti zbog jake imunogeničnosti, fiziološka funkcija ABH-antigena i dalje je nejasna. Osobe koje ne posjeduju A ili B antigen na membranama eritrocita su zdrave osobe, što sugerira da njihova funkcija nije važna, barem ne u moderno vrijeme.

Značajan doprinos u razjašnjavanju njihove uloge imaju evolucijski procesi. Njihova uloga se povezuje s evolucijskim procesima, sugerirajući da su određene krvne grupe u različitim populacijama imale važnu ulogu u prednosti odabira, odnosno prirodnoj selekciji, prvenstveno zbog zaštite od raznih infektivnih bolesti.

Poznato je da osjetljivost na pojedine bolesti može biti povezana s određenim ABO fenotipovima. Na primjer, osobe krvne grupe A češće obolijevaju od karcinoma želuca, dok su želučani i duodenalni ulkus češće povezani s krvnom grupom O. Takve korelacije ostaju i dalje nedorečene, jer osim statističke povezanosti nema valjanog objašnjenja. Kod povećanog rizika za arterijske i venske tromboze kod krvnih grupa non-O postoji objašnjenje u povećanoj aktivnosti koagulacijskog faktora FVIII i von Willebrandovog faktora (vWF). Smatra se da prisutnost ABH-antigena može utjecati na plazmatsku razinu vWF te indirektno FVIII. ABH-antigene determinante su nađene na N-vezanim oligosaharidnim lancima cirkulirajućih vWF i FVIII te se smatra da mogu utjecati na brzinu sinteze i sekrecije unutar stanica endotela (2, 31-34).

Prije 1900. godine i otkrića ABO krvnih grupa mislilo se da je krv svih osoba jednaka pa čak i kod životinja. To nerazumijevanje dovelo je do mnogih fatalnih ishoda prilikom transfuzija krvi, kako životinjske tako i ljudske. Međutim, ljudska tkiva i organi prekriveni su površnim antigenima, aloantigenima. To vrijedi i za krvne stanice, posebno eritrocite.

1930. godine dodijeljena je Nobelova nagrada bečkom liječniku Karlu Landsteineru, za njegovo otkriće krvnih grupa. Tome je prethodio jednostavan eksperiment, temeljen na prethodnim saznanjima o fatalnim ili uspješnim transfuzijama, u kojem je koristio vlastitu krv i krv kolega i osoblja s kojima je radio. Miješanjem različitih kombinacija eritrocita i plazme uočene su različite reakcije koje su nazvane „A“ ili „B“ te situacija u kojoj se ništa nije dogodilo nazvana je prvobitno „C“. Ona je potom zamijenjena slovom „O“, od njemačke riječi „*ohne*“, što znači bez (reakcije). Ili prema drugoj tvrdnji, da se radi o brojci „*nula (O)*“, koja ukazuje

na to da se reakcija nije dogodila. Četvrtu i najrjeđu krvnu grupu AB, kasnije su opisali Decastello & Sturli 1902 godine (2, 35).

Prve pretpostavke o nasljeđivanju krvnih grupa ABO opisali su Ebsstein i Ottenberg još 1908. godine. Međutim, osnove nasljeđivanja ABO-sustava ustvrdili su Ludwik Hirszfild i Erich von Dungem 1910. godine. Oni su dokazali da se antigeni A i B nasljeđuju kodominantno te da su oba antigena dominantna u odnosu na antigen O.

Felix Bernstein je 1924. godine dokazao postojanje više alela na jednom lokusu, tzv. model tri alela (od engl. *three allele model*), prema kojem su aleli A, B i O alternativne forme na jednom genskom lokusu, a djeca nasljeđuju jedan od ova tri alela od svakog roditelja.

Biokemijska građa ABH-antigena je razjašnjena radom Morgana, Watkinsa i Kabata 1950. godine. Svoja ispitivanja su vršili iz materijala ovarijalnih cista čiji sadržaj je bogat krvno grupnim supstancama. Njihove studije su pokazale da strukturu ABH-antigena čine oligosaharidi, a da su imunodominantni šećeri, N-acetilgalaktozamin za antigen A, D-galaktoza za antigen B i fukoza za antigen H.

Biosintetski put tih struktura razjasnili su Morgan i Watkins te zasebno Ceppellini. Bilo je evidentno da oligosaharidne strukture ne mogu biti primarni produkti gena, već su pretpostavili da su sintetizirane uz pomoć aktivnosti enzima kao primarnih genskih produkata. Za uvjerljiviji dokaz moralo se čekati na kloniranje gena ABO (35).

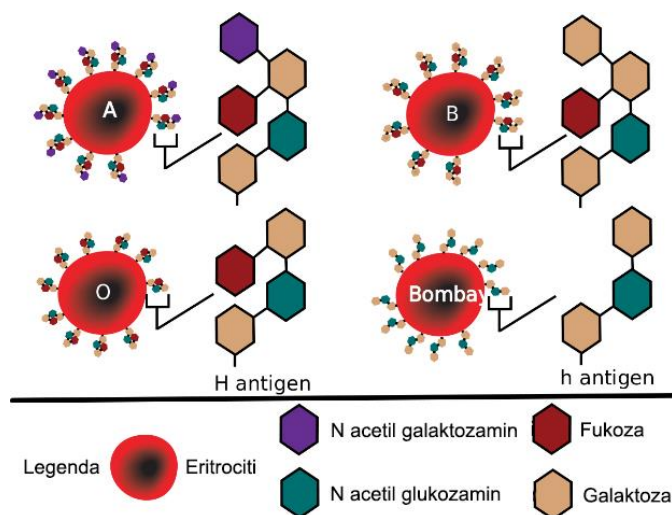
Radom Yamamota u suradnji s Clausenom i Hakomoriem 1990. godine, kloniran je gen ABO, što je omogućilo još preciznije strukturne i funkcionalne analize genoma ABO te A- i B-transferaza, na molekularnoj osnovi. Utvrđeno je da zamjena aminokiselina arginin, glicin, leucin i glicin, kod A-transferaze i glicin, serin, metionin i alanin kod B-transferaze čini razliku u specifičnosti za monosaharide koje prenose te da je alel O nefunkcionalan jer ne kodira informaciju za funkcionalnu glikozil transferazu (31).

2.2.1.2. Biokemijska osnova ABH-antigena

ABH-antigeni su ugljikohidratne determinante glikolipida i glikoproteina te se razlikuju u imunodominantnim monosaharidima na završecima tih lanaca. Krvnu grupu A karakterizira terminalni monosaharid N-acetil-D-galaktozamin, odnosno trisaharid $\text{GalNAc}\alpha 1\text{-3}(\text{Fuc}\alpha 1\text{-2})\text{Gal}\beta\text{-}$. Krvnu grupu B određuje monosaharid D-galaktoza, odnosno trisaharid $\text{Gal}\alpha 1\text{-2}(\text{Fuc}\alpha 1\text{-2})\text{Gal}\beta\text{-}$. Krvna grupa O određena je disaharidom $\text{Fuc}\alpha 1\text{-2-Gal}\beta\text{-}$, kojeg još nazivamo H-antigen.

Te ugljikohidratne determinante nisu primarni proizvodi gena, već su rezultat aktivnosti enzima glikoziltransferaze kojom se vežu na osnovne lance. Funkcionalni aleli A i B na lokusu ABO kodiraju informaciju za sintezu glikoziltransferaza, enzime koji kataliziraju prijenos monosaharida do akceptora, H-antigena, koji je prekursor za A, B, Le^a i Le^b antigene. Gen O sadrži nukleotidnu deleciju i kodira skraćeni protein koji nema mogućnost biti prepoznat kao antigen i tada govorimo o krvnoj grupi O.

H-antigen sintetizira glikoziltransferaza koja je produkt gena FUT1. Vrlo rijetke su osobe koje nemaju H-antigen na svojim eritrocitima te posljedično niti A- i B- antigen, bez obzira na prisustvo gena za A- i B- antigen. Te osobe imaju tzv. Bombay krvnu grupu. H-antigen nastaje kada 1,2-l-fukoziltransferaza katalizira prijenos l-fukoze s gvanozin difosfat (GDP)-l-fukoze na C-2 poziciju terminalne galaktoze na jednom od prekursorskih lanaca (Slika 6).



Slika 6. Biokemijska struktura ABH-antigena

(Preuzeto i prilagođeno: https://en.wikipedia.org/wiki/ABO_blood_group_system)

Ekspresija ABH-antigena ovisi o prisustvu monosaharida i njihovih međusobnih veza na različitim prekursorima. Clausen i sur. su 1985. godine utvrdili da postoje četiri različita prekursorska lanca na koja se vežu ABH-antigeni. Danas je utvrđeno postojanje najmanje pet različitih prekursorskih lanaca. Prisutnost pojedinog lanca na različitim tkivima varira i u vezi je s embrionalnim razvojem i staničnom diferencijacijom. Varijacije u prekursorskim lancima generiraju antigeničnu raznolikost kod ABH-antigena. Krvna grupa A serološki se dijeli na dva fenotipa, A1 i A2. One se razlikuju po broju epitopa na površini stanice. Kod krvne grupe A1

glukoziltransferaza veže terminalni monosaharid na sve tipove lanaca (broj antigena $0,8-2,0 \times 10^6$), a dok kod krvne grupe A2 samo na prekursorske lance tipa-1 i tipa-2 što dovodi do razlike u ekspresiji (broj antigena $0,2-0,3 \times 10^6$). Slično je i s krvnom grupom B gdje glukoziltransferaza ograničeno veže galaktozu samo na prekursorske lance tipa-1 i tipa-2 tako da osobe krvne grupe B na površini izlažu manji broj antigena ($0,7 \times 10^6$), ako ih uspoređujemo s krvnom grupom A (35).

H-antigen koji je produkt gena FUT1, ima veći afinitet za prekursorški lanac tipa-2 nego za lanac tipa-1, dok H-antigen koji je produkt gena FUT 2, ima afinitet za oba prekursorska lanca. H-antigeni (FUT1), koji se nalaze na tkivima ektodermnog i mezodermnog porijekla, su strukture koje su nastale spajanjem na prekursorški lanac tipa-2. Prekursorški lanac tipa-2 promovira, na eritrocitima i na stanicama ektodermnog i mezodermnog tkiva, najveći broj ABH- aktivnih oligosaharida. Prisutan je i u sekretima. Tkiva endodermnog porijekla, kao što su sluznice probavnog i dišnog trakta te žlijezde slinovnice, posjeduju H-antigen (FUT2) koji je nastao spajanjem terminalnog monosaharida na prekursorske lance tipa-1 i tipa-2 (35).

Budući su ABH-antigeni produkti enzimske reakcije, prisustvo, odnosno odsustvo supstrata UDP-GalNAc ili UDP-galaktoze također utječe na ekspresiju ABH-antigena. Novorođenčad u puno manjoj mjeri ekspimiraju (25%-50%) ABH-antigene u odnosu na odrasle. Osim što dostupnost prekursorskih lanaca i supstrata utječe na ekspresiju ABH-antigena, tako i promjene u genskoj strukturi te posljedično transkripciji mRNA, translaciji glikoziltransferaza, post-translacijskoj modifikaciji enzima te translokaciji enzima u Golgijevom aparatu mijenjaju ekspresiju antigena. Tijekom embriogeneze, odnosno stanične migracije i sazrijevanja, od blastocita do trofoblasta utvrđene su promjene u ekspresiji ABH-antigena (31).

Osim fizioloških uzroka, ekspresija ABH-antigena se mijenja i u patološkim stanjima, najčešće kod karcinogeneze. Najčešće se radi o gubitku ili smanjenju antigeničnosti. Gubitak antigena opisan je prvo kod karcinoma želuca i povezuje se sa smanjenom aktivnošću transferaza, dok su geni i mRNA nepromijenjeni. Epigenetički utjecaji, kao što je DNA metilacija u promotorskoj regiji, dovode do inaktivacije transkripcije (31).

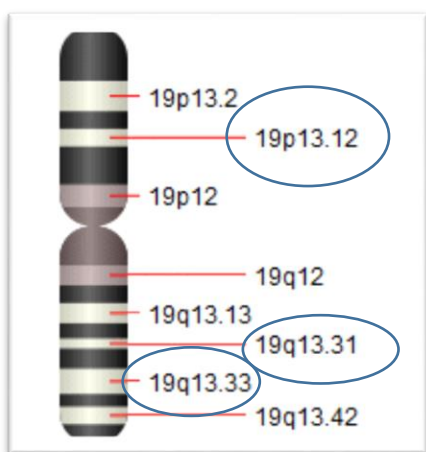
Kod karcinoma kolona situacija je obrnuta, tu se antigeničnost pojačava. U zdravom distalnom kolonu ekspresija ABH-antigena je smanjena zbog smanjene aktivnosti $\alpha 1,2$ -fukoziltransferaze koja je odgovorna za sintezu i H-antigena. Značajna ekspresija A-antigena kod karcinoma pluća tzv. ne malih stanica, kod pacijenata krvne grupe A ili AB, povoljan je prognostički znak (31).

2.2.1.3. Molekularna genetika ABH-antigena

Geni koji reguliraju sintezu eritrocitnih antigena nasljeđuju se prema Mendelovim zakonima i većinom su kodominantni tj. na eritrocitima se ekspimiraju antigeni naslijeđeni od oba roditelja. Postoje i amorfní geni koji se ni u homozigotnoj formi ne iskazuju sintezom antigena. Primjer za to je krvna grupa O u kojoj su oba gena na ABO-lokusu promijenjena tako da nema sinteze enzima glikoziltransferaze. Osobe koje nasljeđuju amorfne gene su tzv. „null“ fenotipovi i oni su bez ijednog antigena određenog sustava krvnih grupa. Osim strukturnih gena, eritrocitne antigene kontroliraju i regulacijski geni.

H-lokus (FUT 1) smješten je na 19. kromosomu (19p13.12.) (Slika 7). Sadrži tri eksona koji obuhvaćaju 5 kb genomske DNA i kodira fukoziltransferazu koja katalizira sintezu H-antigena na eritrocitima. Inaktivni aleli *h* rezultiraju fenotipom *Oh* (Bombay).

Lokus Se (FUT 2) isto je smješten na 19. kromosomu (19q13.3). Sadrži dva eksona koja obuhvaćaju 25 kb genomske DNA. Lokus Se kodira specifičnu fukoziltransferazu koju nalazimo na epitelnim stanicama sekrecijskih tkiva, kao što su žlijezde slinovnice, gastrointestinalni trakt i respiratorni trakt. Enzim katalizira nastajanje H-antigena u svim tkivnim sekretima, osim u likvoru. Genotip sekretora je Se/Se ili Se/se.

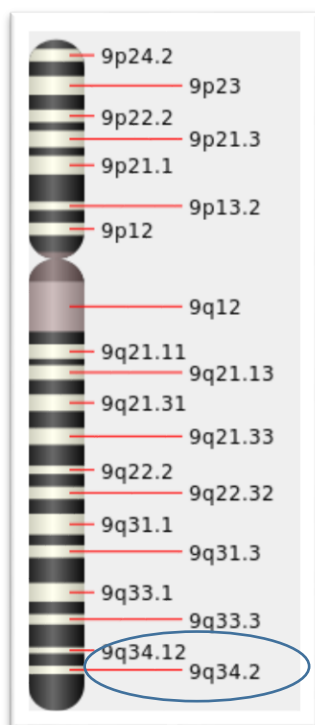


Slika 7. Struktura 19. kromosoma (Preuzeto iz:ghr.nlm.nih.gov)

Ljudski ABO-gen smješten je na kromosomu 9 (9q34.1-q34.2) (Slika 8). Gen sadrži 19514 parova baza (bp) od početnog kodona i uključujući stop kodon. Sadrži 7 eksona i 6 introna koji obuhvaćaju 18-20 kb genomske DNA. Zadnja dva eksona, 6 i 7, kodiraju domenu ABO-glikoziltransferaze, enzima koji modificira sadržaj ugljikohidratnog antigena na eritrocitima i tako određuje tip. Ekson 7 je najduži i sadrži najveći broj kodirajućih sekvenci. Ekson 6 nosi deleciju koja je karakteristična za krvnu grupu O. Aleli A i B razlikuju se po 7 nukleotida, 4 od njih odgovorni su za prisutnost različitih aminokiselina u proteinima (R176G, G235S, L266M, G268A). Ostaci na pozicijama 266 i 268 određuju A- ili B- specifičnost glikoziltransferaze koju kodiraju.

Alel A sadrži cDNA s 10624 bp i kodira za 41 kDa enzimski protein, glikoziltransferazu koja dodaje α - N-acetilgalaktozamin na D-galaktozu na kraju H-antigena stvarajući antigen A.

Alel B kodira glikoziltransferazu koja dodaje α -D-galaktozu na D-galaktozu na kraju H-antigena, stvarajući antigen B. U slučaju alela O, ekson 6 sadrži deleciju koja rezultira gubitkom enzimske aktivnosti. Gen je funkcionalno neaktivan, delecija uzrokuje prijevremenu šifru za završetak čitanja, stop kodon. Alel O se razlikuje od alela A u deleciji samo jednog nukleotida na poziciji 261. Delecija uzrokuje nedostatak enzimske aktivnosti i H-antigen ostaje nepromijenjen (36, 37).



Slika 8. Struktura 9. kromosoma (Preuzeto iz: ghr.nlm.nih.gov)

2.2.1.4. Nasljeđivanje sustava krvnih grupa ABO

Krvne grupe se nasljeđuju od oba roditelja. Geni za A- i B- antigene su kodominantni. ABO-sustav krvnih grupa je pod kontrolom jednog gena s 3 alela: i , I^A i I^B . Dijete nasljeđuje jedan od tri alela, od svakog roditelja. Alel I^A određuje grupu A, alel I^B određuje grupu B, a alel i rezultirati će krvnom grupom O. Kako su aleli I^A i I^B dominantni u odnosu na alel i , samo će osobe koje naslijede genotip ii imati krvnu grupu O. Osobe koje imaju kombinaciju alela $I^A I^A$ ili $I^A i$ imaju krvnu grupu A. Osobe koje naslijede od roditelja $I^B I^B$ ili $I^B i$ nositelji su krvne grupe B. Osobe s genotipom $I^A I^B$ imaju oba fenotipa, jer i A i B pokazuju kodominaciju, što znači da roditelji krvne grupe A i krvne grupe B mogu imati dijete krvne grupe AB. Najčešće se radi o fenotipu *trans*-AB. Suprotno njemu, rjeđi je fenotip *cis*-AB. Tu se radi o jednom enzimu koji stvara oba antigena, i A- i B- antigen. Kao posljedica toga dolazi do slabe ekspresije A- ili B- antigena, Ekspresija nije na očekivanoj razini kao kod osoba s A₁- ili B- krvnom grupom. Roditelji koji posjeduju alele $I^B i$, $I^A i$ mogu imati dijete krvne grupe O (Slika 9) (38).

	I^A	I^B	i
I^A	$I^A I^A$ A	$I^A I^B$ AB	$I^A i$ A
I^B	$I^B I^A$ AB	$I^B I^B$ B	$I^B i$ B
i	$i I^A$ A	$i I^B$ B	ii O

Slika 9. Nasljeđivanje ABO krvnih grupa (Preuzeto: <https://mrwallisscience.wikispaces.com>)

Uz osnovne alele, subtipizacijom je definirano puno rijetkih alela (ukupno 181 alela), prema podacima preuzetim iz *Blood group antigen mutation database*. Aleli se razlikuju po samo nekoliko baza u kodirajućoj sekvenci ili u nekodirajućoj regiji gena, a polimorfizmi su nastali

kao posljedica SNP (od engl. *single nucleotide polymorphism*) ili intragenske rekombinacije uslijed konverzije gena (engl. *crossing over*). Praktično, u imunohematološkom laboratoriju, podtipovi pokazuju razlike u jačini aglutinacije eritrocita s reagensima anti-A, anti-B i anti-A,B. Tako imamo 65 različitih alela A, 45 alela B, 58 alela O i 11 alela AB. Od 65 alela A 6 ih kodira za A1-antigen, 11 ih kodira za A2-antigen, dok ostali aleli kodiraju za promijenjene A-antigene u smislu izrazito slabe ekspresije. Aleli B uključuju 9 normalnih i 38 slabih. Opisano je 11 alela koji kodiraju glukoziltransferazu odgovornu za nastanak A- i B- antigena. 58 alela O uključeno je u sintezu inaktivne transferaze, 45 njih uključuje deleciju 261delG, a ostali aleli uključuju druge mutacije koje u konačnici dovode do potpuno ili djelomično inaktivnih transferaza (26, 35).

2.2.1.5. Raspodjela sustava krvnih grupa ABO i evolucijski pokazatelji

Raspodjela krvnih grupa A, B, O i AB varira diljem svijeta (Slike 10, 11, 12), a mogu se pratiti i varijacije unutar populacija. Rezultati ispitivanja populacijske genetike za sustav ABO utvrdili su najvišu učestalost gena O ($>0,5$). Krvna grupa O je najčešći fenotip ako se gleda globalno. Kod južnoameričkih Indijanaca to je jedini fenotip. Kod Aboriđina mogu se naći samo krvna grupa O i A (Slika 10) (29).

Dijelovi Afrike i Australije imaju povećanu frekvenciju krvne grupe O. Učestalost O-gena nije tako velika na europskom i azijskom kontinentu (Slika 10) (26).

Populacija s povećanom frekvencijom fenotipa A nalaze se najčešće u sjevernoj i centralnoj Europi, kao i dijelu istočne Europe, Poljskoj i Ukrajini. Fenotip A2 najčešće se pojavljuje među Laponcima u sjevernoj Skandinaviji, ali iznimno rijetko u Aziji (Slika 11) (26, 29).

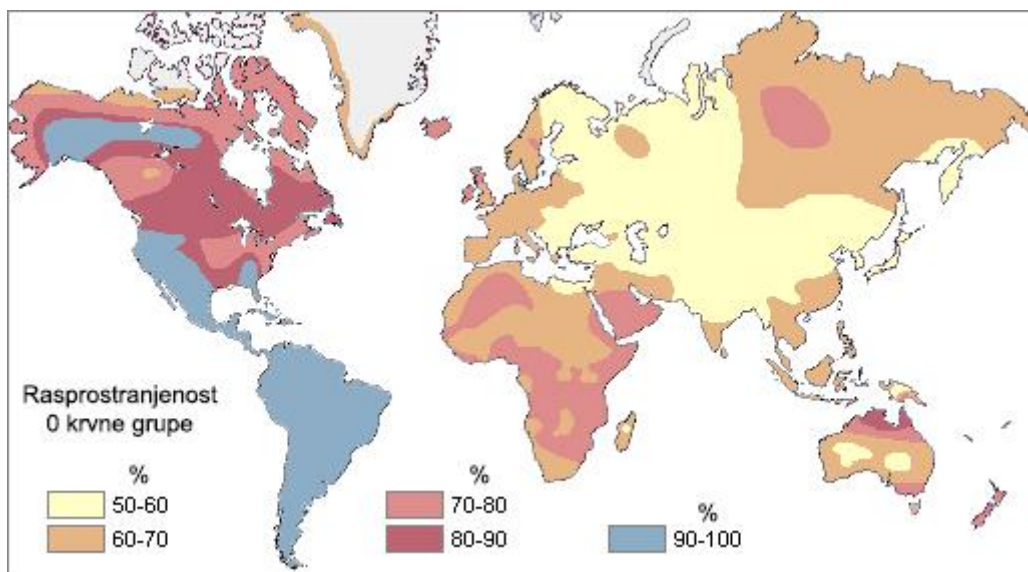
Krvna grupa B je česta u sjevernoj Indiji i Centralnoj Aziji, dok je u zapadnoeuropskim zemljama relativno rijetka ($<0,05$). AB-krvna grupa je najčešća kod japanske populacije i u nekim regijama Kine i Koreje (Slika 12) (26).

Najviše stanovnika koji nemaju alele A i B potječu iz Srednje i Južne Amerike. Slijede stanovnici Sjeverne Amerike i afričkog kontinenta te dio stanovništva u Zapadnoj Europi. Krvna grupa O je najmanje zastupljena u istočnoj Europi (Slika 10).

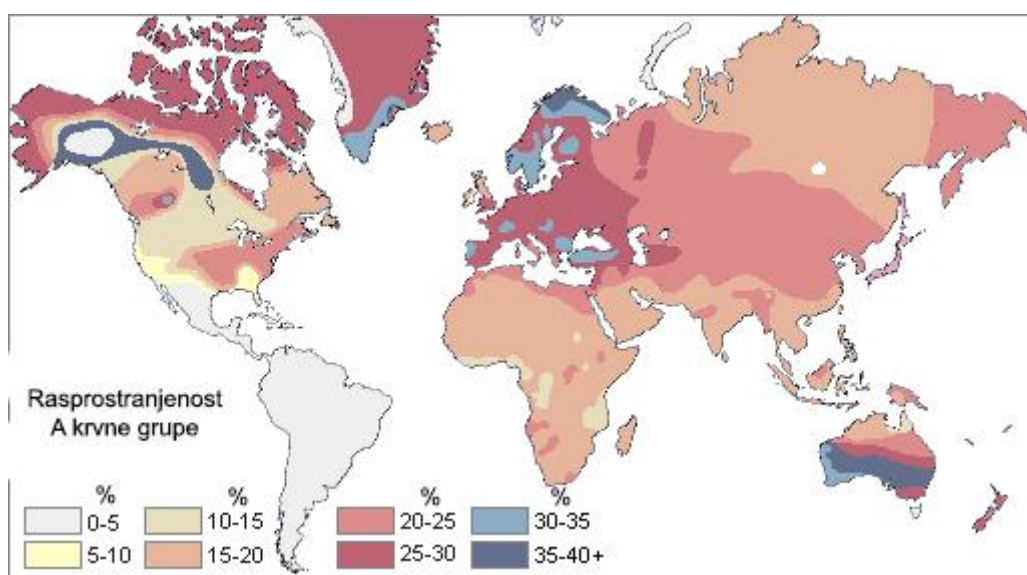
Uspoređujući alele A i B, vidljiva je puno veća zastupljenost alela A. U svijetu je oko 21% nositelja alela A, najviše među sjevernoameričkim Indijancima, australskim Aboriđinima, te stanovnicima skandinavskih zemalja (Slika 11) (26, 40).

Zastupljenost alela B u svijetu je puno manja, samo oko 16 %. (Slika 12). Na američkim kontinentima i Australiji je izrazito mali postotak nositelja alela B, dok su na azijskom kontinentu skoro četvrtina stanovništva nositelji alela B (26) (40).

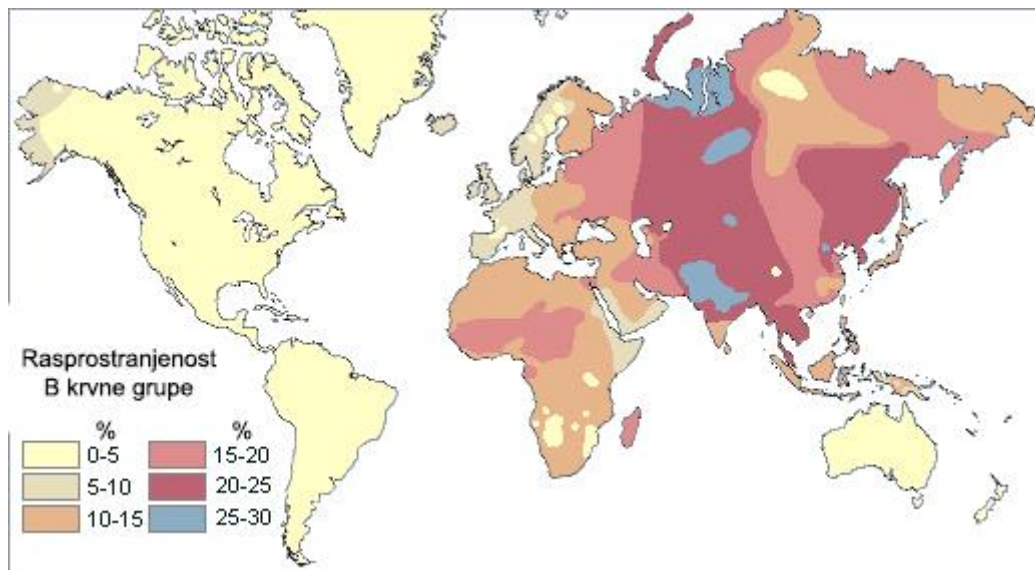
U hrvatskoj populaciji najčešća je krvna grupa A (41%), zatim slijede krvne grupe O (39%), B (15%), a najmanje je zastupljena krvna grupa AB (5%) (41).



Slika 10. rasprostranjenost krvne grupe O



Slika 11. Rasprostranjenosti krvne grupe A



Slika 12. Rasprostranjenost krvne grupe B

(Preuzeto i prilagođeno: anthro.palomar.edu)

Razlog različite pojavnosti fenotipova još nije potpuno jasan. Postoji nekoliko teorija.

Neki evolucijski biolozi tvrde da se najranije razvio alel I^A , a zatim i (delecijom jednog nukleotida) te posljednji I^B . To je u skladu s konceptom evolucijske selekcije kada do promjene u fenotipu dolazi zbog utjecaja patogena na život jedinke. Drugi naziv za evolucijski efekt je *obrana stada* (od engl. *herd immunity*) (35). Bakterije, virusi i paraziti smatraju se pokretačkom snagom za raznoliku geografsku distribuciju fenotipova ABO. Pozitivan selekcijski učinak mogao bi biti uzrokovan odsustvom pojedinih antigena na eritrocitnim membranama i postojanjem ABO-izohemaglutinina i njihove reaktivnosti prema antigenima patogena. Osim toga, mnogi patogeni selektivno vežu ABH-antigene, služeći se njima kao receptorima. Dobar primjer za to su uzročnici malarije.

Osobe krvne grupe O otpornije su na teže oblike bolesti izazvane *P. falciparum*, nego osobe krvne grupe A, što se povezuje s lučenjem proteina rifina. Ovaj protein ima afinitet za eritrocite krvne grupe A, na čiju se površinu lijepi zbog čega nastaju rozete eritrocita koje otežavaju protok krvi kroz kapilare i pridonose patogenezi zaraze ovim uzročnikom (33). Pojava te bolesti je znatno rjeđa kod osoba krvne grupe O nego kod osoba krvne grupe A. Stoga je, u područjima endemičnim za malariju, krvna grupa O najzastupljenija. Drugi primjer pozitivnog selekcijskog učinka je vezana uz područja gdje je harala kolera. Osobe krvne grupe O znatno su osjetljivije na uzročnika, bakteriju *Vibrio cholerae* O1 i O139 u odnosu na fenotipove non-O. To su područja u kojima dominira krvna grupa B. Kod velikih boginja je slična situacija pa je to jedno od objašnjenja za visoku frekvenciju fenotipa A u Europi (2).

Drugo objašnjenje za raznolikost u raspodjeli fenotipova je efekt poznat kao efekt osnivača (od engl. *founder effect*). U skladu je s prihvaćenim obrascima ranog kretanja stanovništva, a rezultat toga je prevladavanje nekih krvnih grupa u pojedinim zemljopisnim područjima. Efekt osnivača objašnjava različite distribucije krvnih grupa među populacijama.

Predstavlja gubitak genetičke varijacije koji se javlja kada novu populaciju uspostavlja vrlo mali broj jedinki izvorne veće populacije. Kao rezultat gubitka genetičke varijacije nove populacije mogu biti izrazito različite, genotipski i fenotipski, od matične populacije iz koje su izvedene (2).

2.2.1.6. Trombocitni ABH-antigeni

Ubrzo nakon otkrića sustava krvnih grupa ABO postalo jasno da se ABH-antigeni ne nalaze samo na membrani eritrocita već su prisutni i na stanicama drugih tkiva te otopljeni u plazmi i tjelesnim tekućinama, ali i na drugim vrstama, uključujući mikroorganizme i biljke (5).

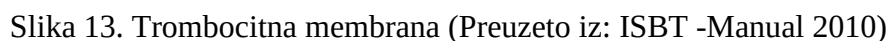
Trombociti predstavljaju najmanje „stanične“ komponente u cirkulaciji i najvažniji su čimbenik u koagulaciji krvi. Kao i eritrociti, trombociti na svojoj površini nose različite imunogenične molekule. Najčešće su to glikoproteini iz skupine integrina i u manjoj mjeri glikolipidi. Te su molekule važne za njihovu agregacijsku sposobnost. Sintetiziraju se u megakariocitima.

Na trombocitnoj membrani nalaze se glikoproteinski kompleksi koji su nosioci specifičnih trombocitnih antigena HPA (od engl. *human platelet antigens*). Antigeni su različito eksprimirani. Te alotipske varijacije su nasljedne i mogu biti prepoznate od imunološkog sustava kao strani antigeni. Najčešće uslijed transfuzije ili tijekom trudnoće. Svaki HPA sustav je rezultat zamjene nukleotidne baze. Najčešće se radi o minimalnim molekularnim razlikama kod glikoproteinskog kompleksa uslijed zamjene jedne aminokiseline na određenoj poziciji. Posljedica je imunizacija, odnosno refraktornost na trombocitne transfuzije ili u kontekstu trudnoće neonatalna aloimuna trombocitopenija.

Osim specifičnih trombocitnih antigena trombociti izražavaju i antigene HLA I (engl. *Human leucocyte antigen klasa I*), ABH, Ii, I P.

Nosioci ABH-antigena na trombocitnoj membrani su glikoproteinski kompleksi. Antigene iz sustava krvnih grupa ABO na površini trombocita čine molekule nastale endogenom sintezom kao i vanjske molekule nastale adsorpcijom otopljenih antigena iz krvi. Glavni nositelj ABH-antigena na trombocitima je glikoproteinski kompleks GPIIb/IIIa s 250,000 molekula po trombocitu. Tu su još kompleksi GPIIb/IX, GPIa/IIa i GPIc, GPIV, GPV, CD31, CD109. Osim glikoproteina, nosioci ABH-antigena na membrani trombocita mogu biti i glikolipidi.

Njihova prisutnost je važna u kontekstu transfuzije trombocitnih koncentrata.



2.2.1.7. ABH-antigeni u tkivnim tekućinama

Iako se na eritrocitnoj membrani nalazi više od 600 različitih antigena, samo je mali broj otopljen u tkivnim tekućinama, sekretima i plazmi. U plazmi nalazimo antigene A, B, H, Le^a, Le^b Sd, P, Pk, T, Bg, CHa, Rga, a u sekretima antigene A, B, H, Le^a, Le^b Sd, T.

Moss je još 1910. godine pokazao da se u serumu krvne grupe A nalazi tvar koja će inhibirati hemolitička svojstva anti-A izohemaglutinina. Kasnije se utvrdilo da se radi o ABH-antigenima.

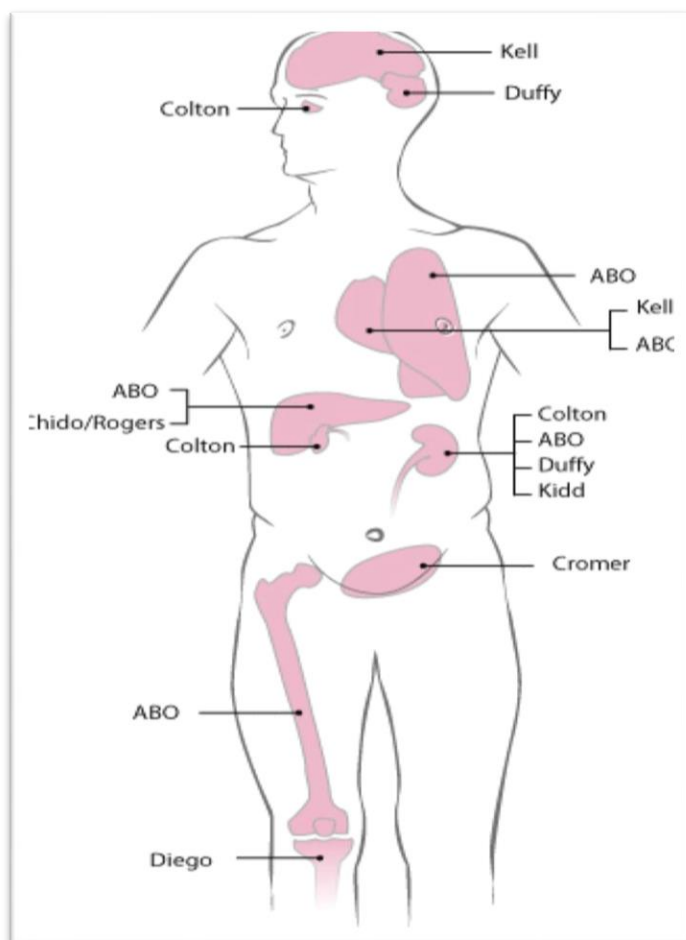
Usprkos tome, što je H-antigen prisutan na membranama stanica skoro kod svih osoba, tek kod 80% populacije možemo ga naći u sekretima. Te osobe su tzv. sekretori. Ukoliko posjeduju gene A i/ili B, imat će prisutne A- i B- antigene u sekretima. Sekretorski status pojedinca reguliran je genima *Se/se* na lokusu FUT2. Osobe koje ne posjeduju gene *Se* na lokusu FUT2 su tzv. nesekretor. Na eritrocitima izražavaju ABH-antigene, ali ne i u sekretima. Gen *Se* je odgovoran za sekreciju H-antigena i dominantan u odnosu na gen *se*. Njihova prisutnost u plazmi je važna u kontekstu podudarnosti kod primjene nepodudarnih krvnih pripravaka (24, 29, 35).

2.3. ABH - tkivno grupni antigeni

Čovjek posjeduje dva velika tkivno grupna antigena sustava, koja su od velike važnosti u transplantacijskoj medicini, ABO i HLA. ABH-antigeni su rasprostranjeni na mnogim tkivima. Szulman je serijom radova šezdesetih godina prošlog stoljeća utvrdio postojanje ABH-antigena na raznim tkivima i u raznim fazama embrionalnog razvoja. Dokazao je da su ABH-antigeni jako izraženi već u petom gestacijskom tjednu i da se pojavljuju na epitelnim i endotelnim stanicama. Tijekom devetog tjedna ekspresija na epitelnim stanicama se smanjuje. Neke stanice poput mišićnih i koštanih tada kompletno gube sposobnost njihove sinteze (2).

Zbog rasprostranjenosti na mnogim tkivima i organima ABH-antigeni se svrstavaju u tkivno grupne antigene (Slika 14). ABH-antigeni se nalaze na stanicama ektodermnog (koža, primarni i sekundarni neuroni, žlijezde slinovnice) i mezodermnog (endotelne stanice krvnih žila, eritrociti, trombociti, limfociti) podrijetla i prisutni su neovisno o sekretornom statusu. Pod kontrolom su gena ABO i H (FUT2). Na stanicama endodermnog podrijetla (epitel respiratornih, probavnih i mokraćnih organa) nalaze se ovisno o sekretornom statusu (2, 43).

Kod transplantacije solidnih organa ABO sustav je značajniji od HLA sustava. Situacija je obrnuta kod transplantacije matičnih stanica gdje je uloga HLA izraženija u puno većoj mjeri.



Slika 14. Raspodjela krvne grupe ABO i ostalih krvnih grupa po organima (Preuzeto od: Flegel WA (2015) Transfusion 55: 47-58)

2.4. ABO-izohemaglutinini u transfuzijskoj medicini

Pokušaji transfuzijskog liječenja rijetko su bili uspješni sve do početka 20. stoljeća. Znanstveni pristup, koji se tada počeo razvijati i primjenjivati u mnogim sferama života, uspješno se odrazio i na transfuzijsku medicinu.

Nakon Landsteinerovog otkrića ABO-sustava krvnih grupa i Ottenbergovog uvođenja ispitivanja križne reaktivnosti između davatelja i primatelja, 1907. godine, započela je praktična primjena znanja o neophodnoj podudarnosti krvi primatelja i davatelja (26).

Od tada pa sve do danas, u cijelom se procesu od darivanja krvi pa do njene kliničke primjene primjenjuju moderni i sofisticirani postupci kojima je glavna težnja postizanje što veće

podudarnosti između davatelja i primatelja te što sigurnije transfuzijsko liječenje. Isti postulati vrijede i u transplantacijskoj medicini.

ABO-sustav krvnih grupa u tome ima najvažniju ulogu. Usprkos relativnoj jednostavnosti A- i B-antigena, što se prije svega odnosi na minimalnu biokemijsku razliku između njih, ABO-sustav krvnih grupa ostaje jedan od najinteresantnijih antigenih sustava i u kliničkom i u znanstvenom smislu.

ABO-izohemaglutinini, kao sastavni dio tog sustava, sastavni su dio imunološke barijere koja predstavlja suštinu problematike te utječe na učinkovitost transfuzijskih terapijskih postupaka. Svi ABO-izohemaglutinini, prema specifičnosti i imunoglobulinskom razredu imaju potencijal kliničke značajnosti.

Zbog svojih karakteristika, transfuzija krvnih pripravaka usporediva je s transplantacijom tkiva u malom. S jedne strane postoje stanice s antigenim mozaikom, a s druge, antitijela u plazmi primatelja i pripravka. Obje komponente imaju potencijal izražen u formi serološke i imunološke reakcije.

Koristeći zlatne standarde i u transfuzijskoj medicini, primjenom ABO identičnih ili podudarnih krvnih pripravaka, pojava štetnih reakcija svedena je na minimum. Štetne reakcije javljaju se u slučaju narušavanja imunološke barijere.

2.4.1. ABO-izohemaglutinini i transfuzija koncentrata eritrocita

Rana razdoblja transfuzijskog liječenja nisu mogla biti uspješna, jer saznanja o aloantigenima i genetskim različitostima jedinki nisu postojala, kao što nisu postojali niti tehnički uvjeti za sigurnu transfuziju. Poslijetransfuzijske reakcije, prije svega, a potom i zgrušavanje krvi u uvjetima izvan tijela te bakterijske infekcije, bile su česte nuspojave u tim pokušajima (24).

Najveći rizik morbiditeta i mortaliteta, danas, odnosi se na akutno oštećenje pluća i bakterijsku kontaminaciju pripravka. Slijedi ABO inkompatibilna transfuzija koncentrata eritrocita koja je uglavnom rezultat administrativne greške.

Membrana svakog eritrocita sadrži milijune antigena koje imunološki sustav prepoznaje kao vlastite, a ne kao strane antigene. Kada bolesnik primi transfuziju koncentrata eritrocita imunološki sustav će reagirati na eritrocitne antigene koji se razlikuju od vlastitih antigena. O vrsti, broju i dostupnosti antigena ovisit će tip i intenzitet imunološke reakcije, koja može biti rana s izraženom intravaskularnom hemolizom te odgođena s ekstravaskularnom hemolizom. Kako bi transfuzija bila sigurna, važno je osigurati da transfundirani antigeni budu podudarni s antigenima bolesnika. Klasično shvaćanje učinka nepodudarnosti krvnih grupa ABO vezano je

uz razgradnju eritrocita uzrokovanu ABO-izohemaglutininima prisutnim u cirkulaciji bolesnika. Takva tzv. velika nepodudarnost može dovesti do fatalnih ishoda zbog akutne imunološke reakcije. Do nepodudarnosti najčešće dolazi zbog ljudske pogreške. Smrtnost u takvim situacijama može iznositi 10%. Na sreću, kod većine pacijenata i nepodudarna transfuzija ne uzrokuje štetne posljedice, jer sam ishod ovisi o količini transfundirane krvi odnosno količini ABO-izohemaglutinina prisutnih kod pacijenta. Sukladno, transfuzijski volumen veći od 50 ml povećava stupanj smrtnog ishoda na 20% (2, 35). Akutna ili rana imunološka reakcija događa se zbog stalnog prisustva ABO-izohemaglutinina koji efikasno aktiviraju komplement do završnog MAC-kompleksa (od engl. *membrane attac complex*) što rezultira intravaskularnom hemolizom. Komplementom posredovana hemoliza ujedno pokreće sistemski upalni odgovor koji u konačnici može dovesti do insuficijencija tkiva i organa te fatalnog ishoda. Stoga se prije svake transfuzije eritrocitnih koncentrata, koncentrat eritrocita izabiru prema standardima transfuzijske medicine. Primatelji krvi transfundiraju se s identičnim krvnim pripravcima, a u slučaju nedostatka takvih koriste se neidentični, ali serološki podudarni pripravci koncentrata eritrocita. To su pripravci koji nemaju A- i/ili B- antigen nepodudaran s ABO-izohemaglutininima bolesnika. Podudarnost obaju vrsta pripravaka provjerava se prijetransfuzijskim ispitivanjem podudarnosti sustava ABO, koja se bazira na interakciji antigena i antitijela te posljedičnoj aglutinaciji eritrocita. Podudarnost ostalih sustava krvnih grupa provjerava se pretraživanjem prisustva antitijela nastalih imunizacijom prethodnom transfuzijom ili trudnoćom te njihovom identifikacijom, kako bi se transfundirali koncentrat eritrocita koji ne posjeduju korespondirajući antigen.

Kod transfuzije eritrocita, a posebno se odnosi na pripravak krvne grupe O, koji predstavlja univerzalni pripravak, u moderno vrijeme ne dolazi do tzv. male nepodudarnosti, jer su eritrocitni pripravci koncentrat u kojem je plazma reducirana na svega 10-12 ml. U tom slučaju, razina ABO-izohemaglutinina koja je posebno izražena kod krvne grupe O, neće doći do izražaja.

2.4.2. ABO-izohemaglutinini i transfuzija koncentrata trombocita

Trombociti na svojoj površini ekspimiraju antigene iz sustava krvnih grupa ABO pa je ABO-podudarnost važna i kod transfuzije koncentrata trombocita. Koncept podudarnosti kod transfuzije koncentrata trombocita obuhvaća puno više i predstavlja ekvivalent transfuzije pune krvi. To posebno vrijedi u situacijama kada su, istovremeno, u značajnom broju prisutni ABH-

antigeni na površini trombocita i ABO-izohemaglutinini u plazmi pripravka. Njihova razina može biti od kliničke važnosti (42).

Koncentrati trombocita se primjenjuju kod klinički značajnih krvarenja, uslijed smanjenog broja trombocita, abnormalne funkcije trombocita i profilaktički. Danas, mnogi novi zahtjevni tretmani ne bi bili mogući bez transfuzije koncentrata trombocita. Rizik od bakterijske kontaminacije uvjetuje rok trajanja koncentrata trombocita. Zbog skladištenja na sobnoj temperaturi iznosi 4-7 dana i predstavlja veliki izazov bankama krvi u optimalnoj opskrbi korisnika koncentratima trombocita. Usprkos nastojanjima u optimizaciji zadovoljenja zahtjeva, nepodudarne transfuzije koncentrata trombocita s obzirom na antigene ABO nisu rijetke i predstavljaju potencijalni izvor neželjenih reakcija transfuzije trombocita. U SAD-u udio nepodudarnih transfuzija iznosi 10-40% (22, 49).

Čimbenici koji doprinose pojavi štetnih reakcija uslijed nepodudarnih transfuzija krvi su mali volumen krvi pacijenta npr. naglašeno krvarenje, izlaganje velikim volumenima plazme tijekom transfuzijskog liječenja odnosno visok titar ABO-izohemaglutinina u pripravku (15, 43, 44).

Transfundiranje koncentrata trombocita mora se provoditi prema standardima transfuzijske medicine, što znači da bi primatelj morao primiti identični krvni pripravak s obzirom na krvnu grupu ABO. Ukoliko to nije moguće, može se transfundirati i neidentičan pripravak.

ABO-neidentične transfuzije koncentrata trombocita dijele se u dvije skupine. Prvu skupinu čine transfuzije koncentrata trombocita bolesnicima koji u plazmi imaju ABO-izohemaglutinine, usmjerene na A- i/ili B- antigene na membranama trombocita iz pripravka. Tada govorimo o velikoj nepodudarnosti.

Drugu skupinu čine transfuzije koncentrata trombocita koji u plazmi, koja je sastavni dio pripravka, imaju ABO-izohemaglutinine, koji se zbog pasivnog prijenosa mogu vezati na A- i/ili B- antigene na trombocitima bolesnika. Tada govorimo o maloj nepodudarnosti.

U slučaju velike nepodudarnosti imunizirani trombociti, koji na svojoj površini mogu imati 30 000 molekula IgG i 350 molekula IgM, odstranjuju se fagocitozom u retikuloendotelni sustav slezene i jetre (46). Najrizičnija je transfuzija koncentrata trombocita dobivenih od davatelja s visokom ekspresijom antigena, primatelju krvne grupe O. U tom slučaju naglašene su obje komponente i antigeni i antitijela. Suprotno, koncentrati trombocita krvne grupe A₂ smatraju se univerzalnim pripravkom koncentrata trombocita, zbog slabe imunogeničnosti i nižeg titra ABO-izohemaglutinina u odnosu na druge krvne grupe (15, 44, 45).

Mala ABO-nepodudarnost može uzrokovati akutne hemolitičke transfuzijske reakcije (AHTR), jer se ABO-izohemaglutinini iz plazme koncentrata trombocita vežu za antigene iz sustava

krvnih grupa ABO na eritrocitima bolesnika. Stvarna klinička učestalost AHTR-a nije poznata. Procijene se kreću između 1:100 do 1:9000 nepodudarnih transfuzija koncentrata trombocita. Različite učestalosti posljedica su različitih volumena plazme u pripravku. Podaci za SAD navode rizik razvoja AHTR-a u rasponu od 1:2000 do 1:45000 na ukupni broj transfuzija koncentrata trombocita. Četverogodišnjom retrospektivnom studijom preciznije se odredila učestalost i iznosi 0,05% (46, 75).

Rizik za razvoj AHTR-a je veći u bolesnika s malim ukupnim volumenom krvi, na primjer u djece, zbog gubitka faktora dilucije. Zatim, kod izlaganja velikim količinama nepodudarne plazme u kraćem vremenskom razdoblju te kod bolesnika krvne grupe A zbog izražene antigeničnosti. Jednako važan čimbenik rizika je i visok titar ABO-izohemaglutinina u plazmi pripravka. Najčešće se javlja kod primjene koncentrata trombocita krvne grupe O.

Prema podacima FDA (od engl. *Food and Drug Administration*) od 1996 do 2006 zabilježeno je šest smrtnih slučajeva, koji su direktno vezani za AHTR. Podaci sustava nadzora nad transfuzijskim liječenjem u Velikoj Britaniji pokazuju da primjena nepodudarnih koncentrata trombocita uzrokuje 20% svih AHTR, a kod djece 33% slučajeva (75).

Prema literaturnim navodima, objavljeno je svega 40-ak slučajeva AHTR-a.

U Republici Hrvatskoj (RH), od kada je uspostavljen sustavni nadzor transfuzijskog liječenja, nije prijavljena niti jedna takva reakcija.

Relativno mala učestalost nepodudarnih transfuzija, u najvećoj mjeri je rezultat nedovoljnog prepoznavanja i prijavljivanja reakcija, a u manjoj mjeri, rezultat razrjeđivanja ABO-izohemaglutinina iz pripravka u plazmi primatelja odnosno neutralizacija krvno grupnim supstancijama otopljenim u plazi primatelja.

Mala nepodudarnost dovodi i do slabijeg porasta broja trombocita, odnosno CCI odgovora (od engl. *corrected count increment*), koji može biti slabiji za 18% u odnosu na identične koncentrate trombocita (46). Bolesnici koji su primili koncentrate trombocita s nepodudarnom plazmom imaju povišenu koncentraciju cirkulirajućih imunih kompleksa, koji nastaju vezanjem ABO-izohemaglutinina iz pripravka za A- i/ili B- krvno grupne supstance u cirkulaciji bolesnika. Trombociti na svojim membranama posjeduju receptore Fc γ za antitijela IgG i receptor C1 σ za komponente komplementa. Kada trombociti iz pripravka i trombociti bolesnika dođu u kontakt s imunokompleksima, oni se vežu preko receptora na membranu trombocita te podliježu brzom fagocitozi u retikuloendotelnom sustavu slezene i jetre. Senzibilizirani trombociti osim što podliježu fagocitozi, bivaju aktivirani. Aktivirani trombociti izlučuju medijatore upale te čimbenike zgrušavanja što u konačnici uzrokuje mikrovaskularna oštećenja

i veno-okluzivne bolesti. Imunokompleksi, osim toga, mogu dovesti do imunomodulacije i slabljenja imunološkog odgovora (15, 48, 50, 52).

Usprkos jasno artikuliranim problemima kod transfuzije koncentrata trombocita postoje velike varijacije u savladavanju imunološke barijere uslijed nepodudarnih koncentrata trombocita. Osnovni princip različitih pristupa je redukcija ABO-izohemaglutinina.

U SAD, prema anketi koju je objavio Fung 2007. godine, 83% transfuzijskih centara radi prema određenoj strategiji, koju su obavezni donijeti prema American Association of Blood Bank (AABB) i College of American Pathologists (CAP). Od njih, samo 1-2% transfuzijskih servisa ispituje razinu ABO-izohemaglutinina kod davatelja i to s različitim pristupima i s različitim kritičnim titrovima (Johanson/ New York IgM ≥ 64 i IgG ≥ 256 , Quillen/Boston IgM ≥ 250 , Cooling/Iowa IgG1 ≥ 128 - mikroaglutinacija u mikrokolonama, NN Pitsburg IgM ≥ 100 aglutinacija u epruveti) (49).

Prema anketi koju je provela Biomedical Excellence for Safer Transfusion, u Velikoj Britaniji se pretražuju svi DDK krvne grupe O na IgM razred ABO-izohemaglutinina, a kritični titar je ≥ 128 ili ≥ 100 , u slučaju da se radi o određivanju titra na automatu ili $<1:20$ s A₂B eritrocitima. U periodu od 2000. do 2005. godine zabilježeno je pet slučajeva AHTR-a. Škotska je s vremenom povisila kriterije graničnog titra za IgM na ≥ 50 , ako se titar određuje na automatu, što je ekvivalent ≥ 64 ako se određuje u mikrokolonama (53, 68).

U Njemačkoj se titar određuje metodom aglutinacije u epruveti, onim davateljima čiji su koncentrat trombocita dobiveni postupkom afereze. Vrijednosti kritičnog titra se kreću za IgM ≤ 32 pa do <128 . IgG-razred ABO-izohemaglutinina se ne određuje. Od ostalih mjera poduzimaju se administrativne mjere te proizvodnja KT iz trombocitno-leukocitnog međusloja (engl. *buffy coat*). Zabilježena su tri slučaja AHTR-a kod djece.

U Danskoj, u slučaju nepodudarnih transfuzija, KT proizvode se u hranjivoj otopini ili AB-plazmi. Titar se ne određuje te nema zabilježenih AHTR-a.

U Finskoj se radi na isti način, titar ABO-izohemaglutinina se ne određuje, vjerojatno zbog toga što finska populacija ima nizak titar ABO-izohemaglutinina. Median, kod krvne grupe O, za IgM iznosi 8, a za IgG iznosi 16.

Italija ima visok postotak ABO-identičnih transfuzija KT, 95,5%, što se bitno razlikuje od SAD-a, gdje je udio nepodudarnih transfuzija 10-40%. U slučaju nepodudarnih transfuzija koncentrata trombocita, određuje se titar ABO-izohemaglutinina ili se proizvode KT u aditivnoj otopini za ciljane skupine. Kritični titar je postavljen za IgM > 64 , a za IgG > 256 .

U Nizozemskoj se postotak ABO-nepodudarnih transfuzija kreće od 10-20%. Plazma se u tim situacijama, prije transfundiranja reducira na 20 ml, za odrasle i 10 ml u djece. Ukoliko se određuje titar, kritični titar iznosi od 128 do 512, razred nije naveden.

U Norveškoj se proizvode trombociti iz trombocitno-leukocitnog međusloja, u aditivnoj otopini. Sve više se proizvode A₂ trombociti, kao univerzalni trombocitni pripravak. Titar se određuje samo kod KT dobivenih aferezom, a granica je postavljena na ≤ 250 , za oba razreda antitijela.

U Poljskoj se poduzimaju samo mjere reduciranja udjela plazme u pripravku, a slično je i u Španjolskoj gdje se jedan dio KT proizvode u aditivnoj otopini.

U Švedskoj se titar određuje krvnim grupama O i iznosi za IgM <100 , a za IgG <400 . U Švicarskoj, gdje se 80% KT proizvodi aferezom i to samo krvne grupe O i A, titar se određuje hemolizionskim testom, titar iznosi >16 (53).

U Japanu određuju visinu titra uz postavljenu granicu od >512 za IgM.

U Brazilu, gdje je predominacija krvne grupe O, uvedeno je u legislativu testiranje hemolizinskim testom, a granični titar je >16 (22, 69).

Općenito, zajedničko svima je obvezna primjena ABO-identičnih KT. U slučajevima kada to nije moguće, preferira se mala u odnosu na veliku ABO-nepodudarnost, što nosi rizik od nastanka AHTR.

Pristupi prevencije su različiti i ovise o financijskom potencijalu i profilu populacije obzirom na razinu ABO-izohemaglutinina.

Najčešći pristup je ispiranje koncentrata trombocita odnosno smanjivanje volumena plazme u trombocitnom pripravku. Oba načina imaju određene nedostatke. Ispiranjem se uklanjaju proteini plazme, a time i ABO-izohemaglutinini. Negativna posljedica je smanjena funkcija trombocita koja se očituje povećanom ekspresijom CD62-molekule i slabijom agregacijskom sposobnošću. Smanjivanjem volumena plazme u pripravku trombocita, funkcija trombocita se ne narušava u tolikoj mjeri, ali zaostaju proteini plazme. Jedan od načina neutralizacije ABO-izohemaglutinina, koji se rjeđe koristi, je neutralizacija ABO-izohemaglutinina dodavanjem doze trombocita krvne grupe non-O u koncentrat trombocita krvne grupe O. Međutim, ova metoda povećava mogućnost stvaranja imunokompleksa, aktivaciju trombocita i stvaranje mikroagregata u pripravku. Slično prethodnom je dodavanje AB-plazme u koncentrat trombocita krvne grupe O. Zbog neizbježnog postupka centrifugiranja smanjena je funkcija trombocita.

Administrativna ograničenja jedan su od načina smanjivanja rizika za AHTR-a. Njima se propisuju gornja ograničenja volumena nepodudarne plazme koja mogu biti transfundirana

jednom pacijentu kroz određeni period. Prema Cooling, to je 1000 ml/tjedan ili 300-500 ml/dan za odrasle i 100- 400 ml/tjedan za djecu do 40 kg (47, 51, 75).

Najbolji način redukcije izohemaglutinina u koncentratu trombocita je priprema trombocita u aditivnoj otopini tzv. PAS (od engl. *platelet additive solution*). To je postupak kojim se plazma zamjenjuje hranjivom otopinom. Priprema koncentrata trombocita u aditivnoj otopini sve češće postaje standardna praksa transfuzijskih centara. Međutim, kod koncentrata trombocita dobivenih aferezom te pripremljenih u aditivnoj otopini, ostatni volumen plazme još je uvijek veći od volumena nakon jednostavne redukcije centrifugiranjem. Iznosi od 90 do 100 ml u odnosu na 80 ml. Valbonesi je opisao AHTR nakon primjene koncentrata trombocita dobivenih aferezom u aditivnoj otopini (74). Također, zabilježene su AHTR-e nakon transfuzije koncentrata trombocita s manje od 50 ml infundirane nepodudarne plazme. Taj podatak je važan jer se koncentri trombocita dobiveni aferezom isključivo transfundiraju novorođenčadi, pedijatrijskim bolesnicima i bolesnicima u kojih je izvjesna dugotrajnija transfuzijska potpora. Afereza je postupak u kojem se dvostrukim centrifugiranjem izdvajaju trombociti jednog davatelja. Primjenom takvih pripravaka bolesnici su izloženi manjem broju fenotipski različitih DDK te mogućoj štetnoj imunizaciji i riziku od prijenosa krvlju prenosivih bolesti. Najbolji način za smanjivanje rizika od poslije transfuzijskih reakcija u ovih bolesnika je primjena ABO-identičnih pripravaka kad god je to moguće. Ukoliko to nije moguće postići, ovoj skupini bolesnika moraju se transfundirati koncentri trombocita koji sadrže nizak titar ABO-izohemaglutinina.

Treba naglasiti da najmanji rizik od AHTR-e, zbog minimalne količine plazme i faktora razrjeđenja, ima transfuzija koncentrata trombocita priređenih od više davatelja iz sloja trombocita i leukocita (*engl.buffy coat*) u aditivnoj otopini. Međutim, opisani su slučajevi AHTR-e i primjenom te vrste koncentrata zbog izrazito visokog titra ABO-izohemaglutinina kod DDK (43, 45, 74).

Za određivanja količine ABO-izohemaglutinina u primjeni su različiti pristupi. Razlikuju se u primjeni različitih metoda, u odabiru imunoglobulinskih razreda koji se ispituju (IgM ili IgG ili oba) te u postavljanju graničnog titra u davatelja. Različit je i način provođenja ispitivanja, od pretraživanja svih DDK, ciljanog pojedinačnog testiranja, samo DDK O krvne grupe (22, 51). Visoki titar različito se tumači i prema podacima za razred izohemaglutinina IgM iznosi od 1:50 do 1:250, a za IgG od 1:128 do 1:512. Široki rasponi prije svega su rezultat primjene različitih tehnika određivanja razine ABO-izohemaglutinina. To je jedan od razloga zašto ne postoji opće prihvaćeni konsenzus za granični titar koji bi bio prediktivan i klinički značajan kod transfuzija

nepodudarnih koncentrata trombocita. Prema kliničkim izvješćima 80% svih AHTR uzrokovano je ABO-izohemaglutininima čiji je titar iznosio više od 1:128 (42, 46).

Prema dostupnim podacima u RH također ne postoji konsenzus oko graničnog titra ABO-izohemaglutinina za transfuziju inkompatibilnih koncentrata trombocita, a metoda određivanja nije jedinstvena.

2.5. ABO-izohemaglutinini u transplantacijskoj medicini

Više je razloga za važnost sustava ABO kod transplantacije solidnih organa. Stalna prisutnost ABO-izohemaglutinina u krvi, snažni imunološki efektorski mehanizmi te prisutnost ABH-antigena na brojnim stanicama, tkivima i organima u organizmu, razlog su hiperakutnom odbacivanju presatka kod nepodudarnih ABO-transplantacija. Dva su čimbenika važna za imunološku barijeru; ekspresija antigena na doniranim organima i količina ABO-izohemaglutinina u plazmi primatelja.

Kod transplantacije tkiva i organa od iznimne je važnosti i sustav antigena tkivne podudarnosti HLA-antigeni (od engl. *human leukocyte antigen*). Sustav HLA odgovoran je za visokospecifičan odgovor na strane antigene i istodobno nereaktivnost na vlastite antigene. Time je očuvan biološki integritet svake jedinke. Stoga je taj sustav odgovoran za prihvatanje ili odbacivanje presatka. Genska regija koja kontrolira sustav HLA-antigena zove se *Glavni sustav histokompatibilnosti ili MHC* (od engl. *major histocompatibility complex*). Otkriven je još 1940. godine, prilikom neuspješnih pokušaja presađivanja kože na alogenim životinjskim modelima za razliku uspješnog presađivanja kod singeničnih životinja. U početku nije bilo saznanja o tome da je odbacivanje tkiva i organa rezultat T-stanične imunosti. Na to se čekalo slijedećih dvadesetak godina. Logično je bilo razmišljanje da na ljudskim stanicama ne postoji sustav koji bi bio odgovoran samo za odbacivanje presađak. Transplantacija tkiva i organa nije prirodni fenomen, već civilizacijski poduhvat i nije bilo razloga da se tijekom evolucije zadrži genska regija koja bi imala ulogu u odbacivanju tkiva i organa. Šezdesetih godina dvadesetog stoljeća otkriveno je da je MHC-gen važan u imunološkom odgovoru na proteinske antigene. Ljudski sustav MHC ima veći broj gena koji su smješteni vrlo blisko, na kraćem kraku šestog kromosoma. Podijeljeni su u tri razreda. Razred HLA-I (A,B,C) i HLA-II (DR, DP, DQ) te HLA-III razred kojeg čine lokusi za komponente komplementa. HLA-I i HLA-II predstavljaju najraznovrsnije gene u genomu sisavaca. Na primjer, samo HLA-B lokus ima 2500 alela. Polimorfizam se odražava na dijelove MHC-molekule koje su važne za kontakt s različitim antigenima. Njihova glavna uloga je u imunološkom prepoznavanju stranih antigena te

poticanje imunološke reakcije. MHC-I molekule predočuju peptidne antigene T-limfocitima CD8+ i time omogućuju njihovo prepoznavanje. Nalaze se na svim stanicama s jezgrom i na trombocitima. Nisu prisutni na neuronima, trofoblastima, epitelnim stanicama rožnice i zametnim stanicama. Na zrelih eritrocitima su zastupljeni iznimno slabo i obilježeni su kao Bennett-Goodspeed (Bg- antigeni). Na trombocitima su prisutni samo HLA -A i HLA -B antigeni. Razlog za tako široku ekspresiju vezan je za funkciju MHC-I molekule, koja predočuje strani antigen T-limfocitima CD8+ i omogućuje odstranjivanje stanica koje su promijenjene bilo infektivnim agensom ili se radi o tumorskim stanicama ili stanicama presatka. MHC-II molekule nalaze se samo na nekim stanicama koje imaju ulogu antigen prezentirajućih stanica za T- limfocite CD4+, koji proizvodnjom različitih citokina potiču humoralnu imunost. To su B-limfociti, monociti, makrofagi, dendritičke stanice. Kod transplantacije tkiva i organa važno je da T-limfociti CD8+ i CD4+ nemaju povod za aktivnosti, što se postiže što većim stupnjem podudarnosti HLA-antigena primatelja i davatelja. Time se postiže trajnost presatka, odnosno sprečava se akutno ili kronično odbacivanje presatka (Tablica 3) (7, 24, 30).

Tablica 3. Prikaz mogućih imunoloških reakcija kod transplantacija nepodudarnih organa.

Transplantacijske reakcije				
	Vrsta	Početak odbacivanja	Mehanizam i histološke promjene	Vrsta imunološke reakcije
Primatelj vs. Presadak	Hiperakutna	Odmah	Uzrokuju prisutna antitijela usmjerena na tkivo presatka, najčešće se radi o ABO nepodudarnosti. Javlja se još tijekom operacije. Odbacivanje je posljedica tromboze i začepjenja krvnih žila presatka	II
	Akutna	Tjedni/ mjeseci	T stanični imunološki odgovor primatelja usmjeren direktno prema stranim MHC molekulama na stanicama presatka ili na MHC molekule predstavljene od antigen prezentirajućih stanica iz presatka Nastaje upalna reakcija i infiltracija leukocita.	IV
	Kronična	Mjeseci/godine	T stanični imunološki odgovor primatelja na MHC molekulu presatka koja je predstavljena od antigen prezentirajuće stanice domaćina. Rezultat su zadebljanja intime krvnih žila i fibroza.	III i IV
Presadak vs. primatelj		Različiti periodi	Odgovor ostatnih T limfocita iz presatka prema tkivu primatelja. Obično se viđa kod transplantacije matičnih stanica.	IV

Preuzeto i prilagođeno: <http://www.stomponstep1.com/transplant-rejection-hyperacute-acute-chronic-graft-versus-host/>

2.5.1. ABO-izohemaglutinini i transplantacija solidnih organa

Sustav krvnih grupa ABO važan je u transplantaciji solidnih organa. Ulogu ABO-izohemaglutinina u transplantacijskoj medicini određuje široka prisutnost ABH-antigena u organizmu. O karakteristikama ABO-izohemaglutinina i ABH-antigenima ovisi veličina i složenost problema. Antigena ekspresija ovisi o krvnoj grupi ABO i podgrupama te o različitoj zastupljenosti na pojedinim tkivima i organima. Varijacije ovise o tipu prekursorskih lanaca. H-antigen može biti vezan na sve prekursorske lance, ali stanice na različitim tkivima različito ekspimiraju prekursorske lance pa su zbog toga različito zastupljeni na različitim tkivima. Različiti tipovi prekursorskih lanaca imaju različite afinitete prema terminalnim monosaharidima što čini razliku u ekspresiji pojedinih antigena. Zastupljenost pojedinih tipova prekursorskih lanaca u vezi je s embrionskim podrijetlom i staničnom diferencijacijom. Tkiva mezodermnog podrijetla općenito ne sintetiziraju tip-1- prekursorškog lanca, s iznimkom eritrocita, dok se tip-2 - prekursorškog lanca nalazi na stanicama ektodermnog i mezodermnog podrijetla. Lanci tipa 3 i 4 nalaze se na stanicama unutarnjih organa, osim na srcu i vaskularnom endotelu. Kod eritrocita, lanci tipa 3 i 4 nađeni su samo na eritrocitima osoba krvne grupe A i AB (Tablica 4) (55, 65).

Tablica 4. Raspodjela prekursorskih lanaca u različitim tkivima

Tip prekursorškog lanca				
	1	2	3	4
Eritrociti	+	+++	++	+
Plazma	+++	+	-/+	-
Vaskularno tkivo	++	+	++	-
Gušterača	+++	+	-/+	
Jetra	++	-	-	-
Bubreg	+	+	-/+	+++
Mokraćni trakt	+		-	+++
Intestinalni trakt	+++	-/+	-/+	-

Era transplantacije solidnih organa započela je 1954. godine uspješnom transplantacijom bubrega. Tim uspjehom otvorila su se vrata razvijanju tehničkih dostignuća. To je omogućilo da se područje transplantacijske medicine proširi na transplantaciju drugih organa, kao što su jetra, srce, pluća, gušteraća i tanko crijevo (56).

2.5.1.1. Transplantacija bubrega

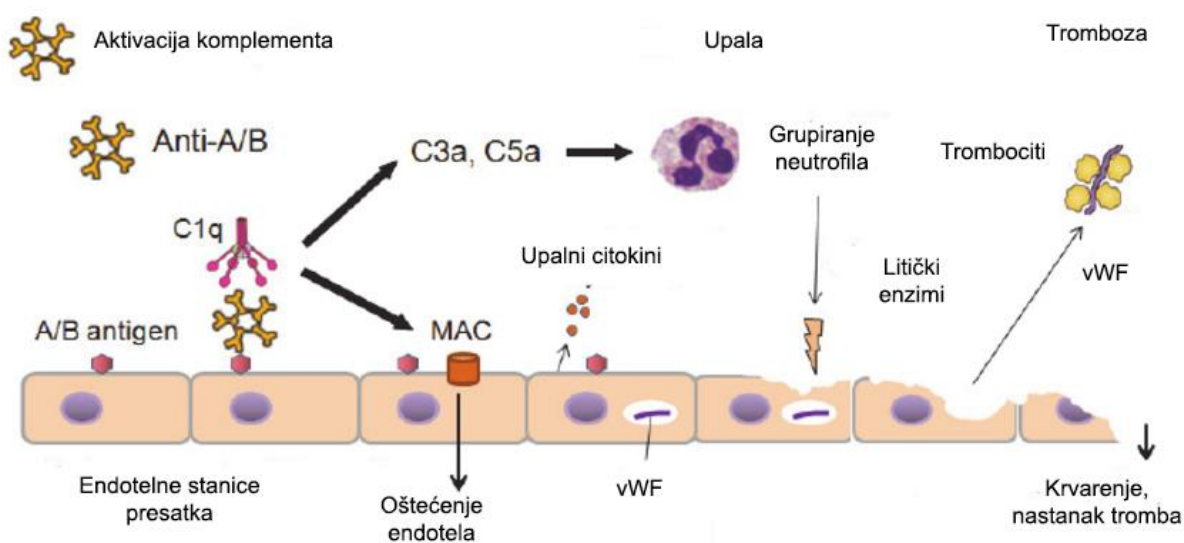
Transplantacija bubrega terapija je izbora za bolesnike u završnom stadiju bubrežne bolesti. Kronična bolest bubrega obično progredira do terminalne bubrežne bolesti, *ERSD* (od engl. *end-stage renal disease*) i uremičkih komplikacija. U tom slučaju dijaliza i transplantacija bubrega su jedina dva terapijska postupka koja spašavaju život bolesniku. U usporedbi s dijalizom, transplantacija je povezana s poboljšanom kvalitetom života i cjelokupnom dugovječnošću. Primjena dijalize duže od šest mjeseci negativno pak utječe na ishod transplantacije bubrega. Osim toga, transplantacija je bubrega ograničena nedostatkom organa, kako živih donora tako i kadavera, jer između bolesnika i davatelja bubrega mora postojati HLA-podudarnost. Broj *ERSD* pacijenata na listi čekanja raste, dok broj dostupnih bubrega ne prati tu dinamiku te je vrijeme do transplantacije bubrega često za te pacijente nedohvatno. Prema podacima Organ Procurement and Transplantation Network, u Sjedinjenim američkim državama na organ čeka 86500 bolesnika, a godišnje se lista povećava za 28000 bolesnika. Oko 5000 bolesnika godišnje umre čekajući organ, a prosjek čekanja do transplantacije je oko četiri godine. 30% bolesnika s liste već ima razvijena autoantitijela, zbog prethodnih transplantacija, transfuzija ili trudnoća. Što je veći stupanj nepodudarnosti, veći je rizik od odbacivanja organa. Prema Nacionalnoj listi u Hrvatskoj na bubrežni organ čeka oko stotinjak pacijenata, dok je prosječno vrijeme čekanja nešto više od dvije godine (podaci Centra za transplantaciju solidnih organa KB Merkur).

Različiti su načini kojima se nastoji povećati lista davatelja i smanjiti lista čekanja. Jedan od načina je ABO-nepodudarna transplantacija bubrega. Do prije trideset godina ABO-nepodudarna transplantacija bubrega bila je nezamisliva odnosno kontraindicirana. Međutim, razvojem i uspostavom strategija kojima se preskaču imunološke barijere nastale zbog HLA- i ABO- nepodudarnosti između primatelja i davatelja povećala se lista potencijalnih davatelja bubrega.

Cjelokupan uspjeh tih postupaka sada je usporediv s ABO-podudarnim transplantacijama. Prisustvo ABH-antigena na bubrežnim stanicama embrija opisao je još Hogman, 1959 godine. Antigeni su otkriveni na sabirnim tubulima i kaliksu (Szulman, 1960), vaskularnom epitelu,

distalnim tubusima, dok ih na glomerularnom epitelu ne nalazimo (Bariety i sur., 1980). Koyama i sur, 1996. su otkrili ABH-antigene prvenstveno na vaskularnom endotelu, glomerulima i intersticiju, dok ih nisu našli na tubulima i mesangialnim stanicama. Utvrdili su da je ekspresija antigena A jača od ekspresije antigena B. Ulfvin i sur. 1993. ustanovili su da je ekspresija antigena A kod krvne grupe A₂ znatno manja u usporedbi s krvnom grupom A, osobito kod tipa prekursorskog lanaca 3 i 4 te da sekretori u znatnoj mjeri bolje eksprimiraju antigene u donosu na nesekretore (55).

Prvi pokušaj ABO-nepodudarne transplantacije opisan je, vrlo brzo nakon prve kompatibilne transplantacije bubrega (Murry i sur. 1954), u izvještaju Hume i sur. 1955 godine. Bio je neuspješan, kao i mnogi pokušaji poslije. Rano odbacivanje ABO-nepodudarnih bubrega pripisano je hiperakutnoj imunološkoj reakciji humoralnog i staničnog tipa uslijed vezanja ABO-izohemaglutinina na stanice bubrežnog vaskularnog endotela, opterećenog ABH-antigenima, što dovodi do aktivacije komplementa, upale, agregacije trombocita, intravaskularne tromboze i okluzije (Slika 15) (56).



Slika 15. Hiperakutna imunološka reakcija humoralnog i staničnog tipa

(Preuzeto:<https://www.intechopen.com/books/understanding-the-complexities-of-kidney-transplantation/abo-incompatible-kidney-transplantation>)

Tek nakon uvođenja imunosupresivnih postupaka koje je prvi primijenio Alexander i sur. 1982. godine, zaredali su uspjesi s ABO-nepodudarnim transplantacijama. Protokol je uključivao plazmaferezu, splenektomiju i imunosupresivnu terapiju; azatoprin, ciklosporine, antilimfocitini globulin i steroide.

ABO-nepodudarne transplantacije bubrega uobičajene su u Japanu. Razlog tome je nedostatak podudarnih organa i vrlo mali udio A₂ podgrupe u populaciji, samo 0,15%. Suprotno, u SAD-u i Velikoj Britaniji udio nepodudarnih transplantacija bubrega je manji od 1%.

Međutim, trendovi se mijenjaju zbog razvoja jednostavnijih i učinkovitijih imunosupresivnih protokola (56, 57, 58).

Tri su načela imunosupresivne strategije: praćenje razine ABO-izohemaglutinina, deplecija antitijela i deplecija limfocita B. Aloantitijela i limfociti B se smatraju glavnim medijatorima oštećenja presatka pa njihova redukcija ima učinak na citotoksičnost ovisnu o komplementu i antitijelima. Indirektno ima učinak na prezentaciju antigena, proupalne citokine i T-staničnu imunost. Prijetransplantacijsko i posttransplantacijsko uklanjanje ABO-izohemaglutinina može se provesti na više načina: klasičnom plazmaferezom, dvostrukom filtracijskom plazmaferezom te imunoadsorbcijom. Određivanje početnog titra ABO-izohemaglutinina i njegovo praćenje vrlo je važno za određivanje uspješnosti navedenih postupaka, a njihova detekcija uoči transplantacije i praćenje dva tjedna nakon transplantacije važno je u predviđanju moguće akutne imunološke reakcije.

Titar ABO-izohemaglutinina kod ABO-nepodudarnih transplantacija bubrega ne smije biti veći od 1:8 (Nelson i sur., 1999, Rydberg, 2001.), 1:16 (Shimmuri i sur., 2000, Tobian i sur. 2008). Prihvatljiv raspon titra varira od 1:4 do 1:32 i ovisi o imunosupresivnim protokolima pojedinih centara (58, 59), a može biti i veći, 1:64 (70).

Inhibicija nastanka novih ABO-izohemaglutinina deplecijom stanica B također je važna u sprečavanju akutne imunološke reakcije. Stariji protokoli uključivali su splenektomiju, dok noviji protokoli koriste anti-CD20 monoklonska antitijela koji se vežu na nezrele i zrele limfocite B inducirajući njihovu apoptozu. U tu svrhu može se koristiti i intravenski imunoglobulini (IVIG), čije djelovanje i dalje ostaje nejasno, ali se reflektira na supresiju plazma stanica, neutralizaciju antitijela, inhibiciju aktivacije komplementa, smanjenu proizvodnju upalnih citokina i/ili povišenu proizvodnju protuupalnih citokina. U primjeni su i najnoviji lijekovi koji uspješno djeluju na plazma stanice i komponente komplementa (56).

Za protokol imunosupresije važna je standardna trostruka imunosupresija lijekovima koji inhibiraju kalcineurin (CNI), antimetabolitima (MMF) i steroidima.

Kombinacije postupaka i terapije različite su i ovise od pristupa koji je uglavnom određen financijskim potencijalom. U svakom slučaju i najskuplji oblik protokola je isplativiji od dugogodišnjih postupaka dijalize. Različite pristupe najčešće su određivali i štetni efekti. Komplikacije su česte zbog virusnih infekcija te povećane incidencije pojave malignosti. One su posljedica jake imunosupresije i deplecije limfocita B (56).

Od 1989. godine, kada su se prvi puta, u Japanu, počele izvoditi nepodudarne transplantacije bubrega, pa do danas, petogodišnje preživljenje presatka značajno je poraslo. Kretalo se od 68% pa do više od 90% (56, 59).

U sedamdesetim godinama prošlog stoljeća započete su transplantacije bubrega podgrupe A2, koja u puno manjoj mjeri izražava antigen A u usporedbi s krvnom grupom A1. A₂-podgrupa čini oko 20% krvne grupe A u bijelaca. Takav koncept ne zahtjeva pretransplantacijski terapijski postupak za redukcije ABO-izohemaglutinina (56).

2.5.1.2. Transplantacija srca

ABO-nepodudarna transplantacija srca nije rutinski postupak kod odraslih osoba. ABO-nepodudarnost može rezultirati hiperakutnim odbacivanjem presatka jer je srce iznimno prokrvljen organ te su ABH-antigeni jače eksprimirani nego na drugim organima. Izloženost ABH-antigena je još naglašenija kod bolesnika koji su A- ili B- sekretori krvno grupnih supstancija.

To uzrokuje visoki rizik za hiperakutno odbacivanje ABO-nepodudarnog organa i stoga je transplantacija srca kontraindicirana u odraslih osoba. Ona se uspješno provodi u novorođenčadi i djece do 14 mjeseci, zbog imunološke nezrelosti. Kod novorođenčadi nedostaju glavni čimbenici koji pokreću imunološke reakcije prilikom odbacivanja organa. ABO-izohemaglutinina nema u visokom titru, a komplement nije razvijen u cijelosti. Neke komponente komplementa, kao na primjer C1q, C4, C3 imaju 50%-tnu aktivnost u odnosu na odrasle, dok su komponente C5 i C7 aktivne 70%, a C9 svega 20% (29). West i sur. su 2001. godine objavili rezultate deset nepodudarnih transplantacija kod djece s teškim srčanim greškama. Petogodišnja stopa preživljavanja iznosila je 80% (60, 61).

HLA-podudarnost kod transplantacije srca ima ograničenu važnost, jer je srce organ koji se ne može konzervirati već se hitno mora presaditi nakon kliničke smrti pacijenta.

Ekspresiju ABH-antigena na mezotelijalnim stanicama epikarda i na kardiovaskularnom endotelu opisao je Thorp 1991. godine. Na stanicama miokarda ABH-antigeni nisu prisutni (55).

2.5.1.3. Transplantacija jetre

Jetra je u odnosu na druge solidne organe imunoprivilegiran organ. Razlog tome je manja ekspresija ABH-antigena zbog prisustva prekursorog lanca samo Tip-a I. HLA-podudarnost kod transplantacije jetre nije potrebna, jer stanice jetre u manjoj količini izražavaju HLA-antigene u odnosu na ostale organe. Ekspresiju ABH-antigena na hepatičkoj arteriji i veni porti, kapilarama i epitelnim stanicama bilijarnog trakta opisao je Hayashi 1992. godine dok ABH-antigeni nisu prisutni na hepatocitima (55).

U usporedbi s transplantacijom bubrega, hiperakutno odbacivanje nepodudarne jetre je rijetko. U većini zemalja transplantacija ABO-nepodudarne jetre se izvodi samo kod bolesnika koji su neposredno životno ugroženi, radi zatajenja jetrene funkcije, a podudaran presadak nije dostupan.

2.5.2. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) je postupak koji se brzo razvija i predstavlja potencijalni način izlječenja malignih i nemalignih hematoloških bolesti, solidnih tumora, autoimunih bolesti, nasljednih metaboličkih bolesti i nasljednih imunodeficijencija. TKMS može biti autologna ili alogena, a izvor matičnih stanica može biti koštana srž, periferna krv ili pupkovina. Danas je periferna krv u velikoj mjeri zamijenila koštanu srž kao izvor matičnih stanica, posebno kod autologne TKMS, jer se matične stanice lakše prikupljaju, a broj neutrofila i trombocita se brže oporavlja. TKMS pupkovine je uglavnom rezervirana za djecu, zbog manjeg broja matičnih stanica.

Ne postoje kontraindikacije za autolognu TKMS. Kontraindikacije za alogenu TKMS su relativne i uključuju dob, prethodne TKMS i značajne komorbiditete. Preduvjet za uspješnu alogenu TKMS je potpuna podudarnost između davatelja i primatelja u lokusima HLA-A, HLA-B, HLA-C i -DR B1 i -DQ B. Zbog načina nasljeđivanja ovih gena moguća je potpuna HLA podudarnost između potomaka istih roditelja. Budući da samo 1/3 bolesnika ima takvog srodnika često su davatelji podudarni nesrodnici, koji se pronalaze putem internacionalnih registara (62).

Danas se sve više primjenjuje liječenje transplantacijom alogeničnih matičnih stanica od HLA-podudarnog nesrodnog davatelja.

Alogena transplantacija TKMS ne zahtjeva ABO-podudarnost između primatelja i davatelja. ABH-antigeni nisu prisutni na matičnim stanicama. ABO-nepodudarnost može usporiti

oporavak eritrocitne loze, ali nema učinak na oporavak drugih stanica, ne povećava rizik odbacivanja transplantata niti povećava incidenciju reakcije presatka prema primatelju, GvHD (od engl. *graft versus host disease*).

Razdoblje hematološkog oporavka, nakon TKMS, može varirati od 10 do 25 dana, ovisno o vrsti transplantacije (alogeni/autologna), o vrsti presatka (koštana srž, matične stanice iz periferne krvi, pupkovina), kao i o osnovnoj bolesti. Transfuzijska služba se u tim situacijama suočava s velikim izazovima u pre- i post- transplantacijskom periodu. Ishod transplantacija može biti ugrožen primjenom neodgovarajuće transfuzijske potpore, imunohematoloških posljedica zbog ABO-nepodudarnosti primatelja i davatelja, ali i zbog aloimunizacije na HLA-antigene, imunosupresije i transfuzijom uvjetovane reakcije presatka prema primatelju, TA-GvHD (od engl. *Transfusion associated graft versus host disease*,) te mogućeg prijenosa infekcije *Citomegalovirusom* (CMV) (62, 63).

Zbog činjenice da se ljudski leukocitni antigeni sustav nasljeđuje neovisno od krvno grupnog sustava, 40-50% svih alogeni TKMS provodi se usprkos ABO-imunološkoj barijeri. Odnos ABO-sustava davatelja i primatelja može se svrstati u četiri kategorije. Prva je ABO-podudarnost, a ostale tri vrste nepodudarnosti su *velika*, *mala* i *velika/mala*. Velika nepodudarnost se javlja kada su davateljevi eritrociti, koji se nalaze u presatku, nepodudarni s primateljevom plazmom. Mala nepodudarnost se javlja kada je davateljeva plazma nepodudarna s eritrocitima primatelja. Kod velike i male nepodudarnosti javljaju se sve moguće kombinacije nepodudarnosti (Tablica 5).

Tablica 5. Vrste nepodudarnosti

Krvna grupa primatelja	Krvna grupa davatelja	Krvna grupa primatelja	Krvna grupa davatelja	Krvna grupa primatelja	Krvna grupa davatelja
Velika nepodudarnost		Mala nepodudarnost		Velika/mala nepodudarnost	
<i>O</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>O</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
<i>O</i>	<i>B</i>	<i>B</i>	<i>O</i>	<i>B</i>	<i>A</i>
<i>O</i>	<i>AB</i>	<i>AB</i>	<i>O</i>		
<i>A</i>	<i>AB</i>	<i>AB</i>	<i>A</i>		
<i>B</i>	<i>AB</i>	<i>AB</i>	<i>B</i>		

Zbog tih nepodudarnosti javljaju se očekivane imunohematološke posljedice.

Kod velike nepodudarnosti prva komplikacija je akutna hemoliza tijekom infuzije presatka, jer presadak sadrži inkompatibilne A- i B- antigene u odnosu na prisutne ABO-izohemaglutinine primatelja. Rizik se povećava s transfuzijskim volumenom stanica i ovisno o vrsti presatka.

Matične stanice prikupljene aferezom imaju najmanji volumen eritrocita (cca 20 ml), dok matične stanice prikupljene iz koštane srži i pupkovine imaju velik udio eritrocita (cca 350 mL) i u tom je slučaju potrebno prije infuzije obraditi presadak kako bi se smanjio broj inkompatibilnih eritrocita. Mogućnost sprečavanja akutne hemolize je i snižavanje razine ABO-izohemaglutinina u primatelja plazmaferezom. Druga potencijalna komplikacija koja se može dogoditi nakon velike nepodudarnosti je retikulocitopenija koja se javlja u manje od 1% ili PRCA (od engl. *pure red cell aplasia*) koja traje više od 60 dana nakon transplantacije zbog odsutnosti eritroidnih prekursora u koštanoj srži. Nastaje zbog djelovanja ABO-izohemaglutinina primatelja, koji suprimiraju eritropoezu djelujući na eritroidne progenitorske stanice, na kojima su već razvijeni ABH-antigeni. Nastaje u oko 20% slučajeva ABO inkompatibilnih transplantacija. ABO-izohemaglutinini su proizvod B-limfocita i plazma-stanica koje su preživjele mijeloablaciju. Obično, ABO-izohemaglutinini nakon transplantacije bivaju prisutni do 60 dana, nekad i duže i do 120 dana, a u jednom slučaju bili su prisutni i više od 600 dana (62, 63, 64).

Kod male nepodudarnosti moguća je i rana i kasna hemoliza primateljevih eritrocita tijekom te 7-10 dana nakon infuzije presatka. Nastaju zbog pasivnog prijenosa ABO-izohemaglutinina i aktivnih limfocita B iz presatka koji dodatno proizvode ABO-izohemaglutinine (tzv. sindrom putujućih limfocita). Rizik za ranu hemolizu se povećava s volumenom plazme u presatku, koji je najveći kod transplantacije matičnih stanica iz koštane srži (cca 1000 ml) i razinom izohemaglutinina te relativno malim volumenu krvi u primatelja. Rizik za kasnu hemolizu je veći kod transplantacija matičnih stanica iz periferne krvi što se objašnjava i do deset puta većim brojem limfocita u presatku u odnosu na transplantaciju matičnih stanica iz koštane srži.

Potporna transfuzijska terapija je jedan od presudnih čimbenika za ishod transplantacije krvotvornih matičnih stanica. Strategija transfuzijske terapije mora se zasnivati na tome da se u obzir uzimaju ABO-krvne grupe primatelja i davatelja. Ona mora biti serološki podudarna.

Kod velike nepodudarnosti tijekom prve faze (kemoterapija) transplantacije matičnih stanica transfundiraju se krvni pripravci krvne grupe primatelja. Tijekom prihvatanje transplantata transfundiraju se koncentрати eritrocita krvne grupe primatelja, a koncentрати trombocita i plazma krvne grupe davatelja. U trećoj fazi kada je došlo do prihvatanja presatka i u cirkulaciji nisu prisutni primateljevi ABO-izohemaglutinini, moraju se transfundirati krvni pripravci davatelja matičnih stanica (29, 62-64).

Kod male nepodudarnosti, tijekom prve faze transplantacije matičnih stanica transfundiraju se krvni pripravci krvne grupe davatelja. U drugoj fazi, tijekom prihvatanje transplantata, transfundiraju se koncentрати eritrocita krvne grupe davatelja, a koncentрати trombocita i plazma

krvne grupe primatelja. U trećoj fazi kada je došlo do prihvatanja presatka (nestanak primateljevih eritrocita) moraju se transfundirati krvni pripravci krvne grupe davatelja matičnih stanica (29, 62-64).

Kod istovremeno velike i male nepodudarnosti moguće su sve komplikacije. U prvoj fazi transplantacije matičnih stanica transfundiraju se krvni pripravci krvne grupe primatelja. U drugoj fazi, tijekom prihvatanje transplantata, transfundiraju se koncentрати eritrocita krvne grupe O, a koncentрати trombocita i plazma krvne grupe AB. U trećoj fazi, nakon nestanka ABO-izohemaglutinina transfundiraju se koncentрати eritrocita krvne grupe davatelja, a nestankom eritrocita primatelja iz cirkulacije, transfundiraju se koncentрати trombocita i plazme krvne grupe davatelja. (29, 62-64).

2.6. Ispitivanje titra ABO-izohemaglutinina

Kvantifikacija reaktivnosti specifičnih ABO krvno grupnih antitijela je jedna od najtežih za standardizaciju. Optimalne metode se još uvijek ispituju i ne postoji opće prihvaćena metoda za kvantifikaciju reaktivnosti ABO-izohemaglutinina. Stoga su u primjeni različite metode. Od primjene klasične metode direktne i indirektnе agutinacije u epruveti, aglutinacije u mikrokolonama, aglutinacije na mikropločama u automatiziranom sustavu pa do hemolizinskog testa. Ovisno o primijenjenoj metodi rezultati testova variraju i teško su usporedivi. Varijacije u rezultatima mogu dosežati od tri do pet dilucijskih faktora. Svaka metoda pokazuje različite detekcijske mogućnosti. Najčešće se koristi klasična metoda aglutinacije u epruveti. Od svih laboratorijskih metoda ona je jedna od najtežih za standardizaciju pa su među laboratorijske razlike značajne, a rezultati teže usporedivi u odnosu na rezultate dobivene istom metodom kao i drugim metodama. Klasična metoda u aglutinacije epruveti razlikuje se među laboratorijima u brojnim detaljima, uključujući ispitivani uzorak, odabir medija za razrjeđivanje, trajanje inkubacije, parametre centrifugiranja, vrstu sulfidrilnog reagensa za uklanjanje IgM antitijela iz plazme ili seruma, korištenje poliklonskih ili monoklonskih antitijela za dokazivanje IgG razreda ABO-izohemaglutinina te konačno način tumačenja rezultata reakcije (22, 71,73).

Usljed velikih varijacija u izvedbi javila se potreba za uspostavom metode koja bi bila opće prihvaćena. Prednosti nove metode trebale bi se očitovati u kraćem vremenu izvedbe ispitivanja u odnosu na klasičnu metodu, jednostavnijem i egzaktnom protokolu te jasnijem i konzistentnijem očitavanju rezultata te boljoj reproducibilnost (66, 67, 73).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICI

Istraživanje je provedeno na 1200 uzoraka krvi, dobrovoljnih davatelja krvi. Od 1200 uzoraka, tri uzorka nisu bila obuhvaćena ispitivanjem, zbog nedostatnog volumena. Sva ispitivanja su provedena na populaciji DDK koji se odazivaju na akcije darivanja Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i Hrvatskog crvenog križa. Oni predstavljaju populaciju ljudi koji nastanjuju Zagreb, širu zagrebačku regiju i ostale županije te čine reprezentativan uzorak pučanstva zemljopisnog porijekla iz cijele Hrvatske. Svi davatelji krvi hrvatski su državljani. Odobrenje za ispitivanje dalo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičko povjerenstvo Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu.

Dobrovoljni davatelji krvi su populacija zdravih ljudi u dobi od 18 do 65 godina koji zadovoljavaju sve postavljene medicinske kriterije za darivanje krvi propisane u Preporukama Vijeća Europe. Davateljima starijim od 65 godina odobreno je darivanje krvi, temeljem liječničkog mišljenja. Slučajnim odabirom postali su dio ispitne skupine.

Putem informativnog pristanka, DDK su bili upoznati s njihovom ulogom u ispitivanju kao i sa svrhom i ciljem ispitivanja. Njihov identitet bio je zaštićen na način, da su uzorci obilježavani isključivo identifikacijskim brojem donacije. Prije uzimanja uzoraka svaki davatelj krvi je svojim potpisom dao pristanak za sudjelovanje u ispitivanjima.

Od 1200 uzoraka, 600 uzoraka uzeto je od ženskih DDK i 600 uzoraka od muških DDK s ravnomjernom raspodjelom prema krvnim grupama O, A i B, tako da je broj uzoraka po krvnoj grupi, spolu i godišnjem dobi $N=50$.

Prema dobnim skupinama DDK su bili izdvojeni u skupine od 18 do 29 godina ($N=356$), od 30 do 39 godina ($N=311$), od 40 do 49 godina ($N=268$) od 50-59 godina ($N=197$) i više od 60 godina ($N=65$) (Tablica 6).

Tablica 6. Ispitanici prema spolu, dobi i krvnim grupama

DDK	Spol		Dob		Krvne grupe		
	Ž	M	Median		A	B	O
(N=1197)	N=598	N=599	Ž	M	N=399	N=400	N=398
			36(18-69)	38 (18-66)	Ž/M	Ž/M	Ž/M
			95%CI	95%CI			
			(34-37)	(37-39)			
Zima	N=150	N=150			N=50/50	N=50/50	N=50/50
Proljeće	N=150	N=150			N=50/50	N=50/50	N=50/50
Ljeto	N=148	N=150			N=50/50	N=50/50	N=48/50
Jesen	N=150	N=149			N=50/49	N=50/50	N=50/50

Uzorak krvi vađen je u biokemijsku epruvetu za dobivanje serumskog uzorka. Do izvođenja testiranja uzorci su bili pohranjeni na -20° C. Volumen arhiviranog uzorka iznosio je 2x1ml.

Izdvojena skupina davatelja ispitana je na prisustvo križne reaktivnosti ABO-izohemaglutinina i respiratornih alergena. Radi isključivanja čimbenika iz seruma, koji bi mogli utjecati na lažnu reaktivnost, koristili su se eluati. Radi uspješnog izdvajanja eluata skupina je bila izdvojena po visini titra ABO-izohemaglutinina. Izdvojeni su DDK s titrom >32. Zbog zahtjevnih i složenih postupaka ispitan je ograničen broj DDK. Ukupno je ispitan 41 DDK.

Radi mogućih objašnjenja utjecaja i drugih vanjskih čimbenika na razinu ABO-izohemaglutinina, izdvojena skupina DDK anketirana je o mogućim hiperimunizacijskim epizodama: primljenim transfuzijama, trudnoćama, cijepljenjima i prehrambenim navikama te alergijama.

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje razine ABO-izohemaglutinina

Za određivanje razine (titra) ABO-izohemaglutinina kod svih ispitanika koristila se metoda mikroaglutinacije u gel kolonama, *DiaMed standard technique*.

Za dokazivanje IgM-razreda antitijela, kao i njihovog titra koristile su se mikrokolone impregnirane fiziološkim medijem; "ID-Card NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutination", proizvođač Biorad (Slika 16). Uzorci su razrijeđeni u dvostrukim serijskim razrjeđenjima u 15M fiziološkoj otopini. U reakcijama su se koristili testni eritrociti koncentracije 0,8% krvnih grupa A1, za dokazivanje anti-B izohemaglutinina i testni eritrociti krvne grupe B za dokazivanje anti-A izohemaglutinina. U svaku kolonu dodano je 50 μ L pojedinog razrjeđenja seruma ispitanika i 50 μ L testnih eritrocita. Nakon dodavanja reaktanata, mikrokartica s gel kolonama se inkubirala 15 minuta na sobnoj temperaturi (+18°C do +25°C) te nakon toga centrifugirala 10 minuta - ID Centrifuge 24S DiaMed.

Očitavanje hemaglutinacijskih reakcija izvodilo se prema uputama proizvođača mikrokolona Biorad, kako je prikazano na slici 17.

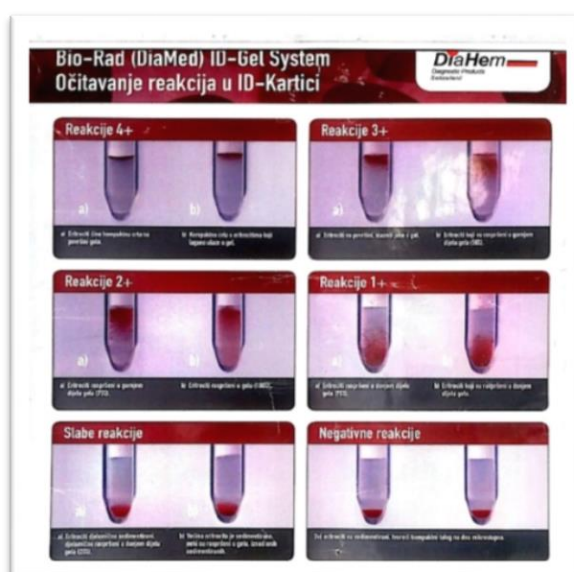
Za dokazivanje IgG razreda antitijela, kao i njihovog titra koristile su se mikrokolone impregnirane s antitijelima specifičnim za ljudski IgG; "ID CardCoombs Anti-IgG", proizvođač Biorad (Slika 16). Uzorci su razrijeđeni u dvostrukim serijskim razrjeđenjima u 15M fiziološkoj otopini. U reakcijama su se koristili testni eritrociti koncentracije 0,8%, krvne grupe A1, za dokazivanje anti-B izohemaglutinina i testni eritrociti krvne grupe B za dokazivanje anti-A izohemaglutinina. U svaku kolonu dodano je 25 μ L pojedinog razrjeđenja seruma ispitanika i 50 μ L testnih eritrocita. Nakon dodavanja reaktanata mikrokartica s gel kolonama se inkubirala 15 minuta na +37°C - Incubator 32 SII Diamed te nakon toga centrifugirala 10 minuta - ID Centrifuge 24S DiaMed.

Očitavanje hemaglutinacijskih reakcija izvodilo se prema uputama proizvođača mikrokolona Biorad, kako je prikazano na slici 17.

Razina izohemaglutinina prikazana je kroz vrijednosti titra IgM- i IgG- razreda antitijela. Titar predstavlja recipročnu vrijednost razrjeđenja seruma u kojem je hemaglutinacija još prisutna, odnosno vidljiva.



Slika 16. ID-Card NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutination i ID-CardCoombs Anti-IgG



Slika 17. Evaluacija hemaglutinacijskih reakcija

3.2.2. Analiza križne reaktivnosti ABO-izohemaglutinina i alergena

Kod izdvojene skupine DDK (N=41) ispitan je uzorak eluata u kojem su se nalazili ABO-izohemaglutinini, prethodno vezani te toplinski eluirani s A- ili B- eritrocitih antigena.

Prisutnost ABO-izohemaglutinina u eluatu je provjerena testom hemaglutinacije u mikrokolonama za oba imunoglobulinska razreda.

Jedan uzorak bio je negativan, očekivano, jer se radilo o krvnoj grupi AB, koja je korištena kao negativna kontrola.

Križna reaktivnost četiri grupe alergena s oba razreda ABO-izohemaglutinina određena je u tri ponavljanja, u različitim vremenskim periodima.

Eluat je testiran optimiziranim *in house* imunoenzimskim testom na prisutnost križne reakcije s respiratornim alergenima (Tablica 7). Metodologija uključuje vezanje pročišćenih alergenskih ekstrakata (trave, korovi, stabla) na mikrotitarske pločice u karbonatnom puferu te dodavanje u reakciju eluiranih ABO-izohemaglutinina. Spektometrijska detekcija prisutnih alergen-specifičnih ABO-izohemaglutinina omogućena je vezanjem specifičnih antitijela (mišje antitijelo specifično za ljudsko IgM-antitijelo i mišje antitijelo specifično za ljudsko IgG-antitijelo), konjugiranih s enzimom peroksidazom iz hrena (od engl. *horseradish peroxidase*, *HRP*) za Fc-krajeve IgM- ili IgG- ABO-izohemaglutinina te nastanka enzimskog produkta nakon reakcije s pojačivačima i tetrametilbenzidin supstratom (TMB). Spektrofotometrijska detekcija izvodila se na valnim dužinama od 450 nm i 620 nm.

Tablica 7. Alergeni korišteni u analizi križne reaktivnosti

Naziv alergenskog ekstrakta	konc. prot. mg/ml	MIX
Poa pratensis	1.3125	1-trave
Festuca elatior	2.25	
Lolium perenne	1.3125	
Anthoxanthum odoratum	2.4375	2-trave
Zea mays	1.375	
Secale cereale	1.375	
Ambrosia elatior	0.5	3-korovi
Plantago lanceolata	0.6875	
Taraxacum officinale	1.875	
Urtica dioica	1.4375	4-stabla
Corylus avellana	1.375	
Betula verrucosa	0.5625	

Elucija ABO-izohemaglutinina razreda IgG i IgM

Za odvajanje IgG-razreda ABO-izohemaglutinina iz seruma, serum se tretira s 0,01M ditiotreitolom kojim se uklanja IgM-razred antitijela. U tako obrađenom serumu ostaje samo IgG-razred antitijela. Tako obrađen serum spaja se s istim volumenom ABO-nepodudarnih eritrocita i inkubira 90 minuta na +37°C. Na eritrocitne antigene vezat će se kompatibilni ABO-izohemaglutinini. Nakon trostrukog pranja u fiziološkoj otopini i odvajanja supernatanta, na talog se dodaje fiziološka otopina u omjeru 1:1 prema ostatnom volumenu eritrocita i inkubira 10 minuta na 56°C. Poslije centrifugiranja na 3000 okretaja/3 minute odvaja se supernatant, odnosno eluat u kojem se nalaze ABO-izohemaglutinini IgG-razreda.

Za odvajanje IgM-razreda ABO-izohemaglutinina iz seruma, serum se spaja s istim volumenom ABO-nepodudarnih eritrocita i inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi. Na eritrocitne antigene vezat će se kompatibilni ABO-izohemaglutinini. Nakon trostrukog pranja u 15M fiziološkoj otopini i odvajanja supernatanta, na talog se dodaje 15M fiziološka otopina u omjeru 1:1 prema ostatnom volumenu eritrocita i inkubira 10 minuta na +56°C. Poslije centrifugiranja na 3000 okretaja/3 minute odvaja se supernatant, odnosno eluat u kojem se nalaze ABO-izohemaglutinini IgM-razreda.

In house imunoenzimski test - IgG

1. Jažice se oblože s 50 µl/jažici nativog antigena. Koncentracija pojedine grupe antigena iznosi 1.8 µg/ml 0.1 M Na-carbonate, pH 9.6.
2. Obložene mikroploče se preko noći drže na +4°C na platformi koja ih miješa.
3. Sadržaj jažica se izbacuje.
4. Površina jažica se učvrsti s 100 µl/jažici pufera za blokiranje, mikroploče se preko noći drže na +4°C na miješalici.
5. Mikroploča se ispere s puferom za ispranje; 50 µl/jažici (vrijeme natapanja 15-30 sec.). Mikroploča se drže zatvorene u plastičnim vrećama s desikatorom i suše preko noći na +4°C.
6. U jažicu se doda 50 µl/jažici eluata, razrijeđeni 1:10 u diluentu za razrjeđivanje. Mikroploče se inkubiraju 4h at +37°C, na miješalici.
7. Mikroploče se isperu s 150 µl/jažici s puferom za pranje, šest puta (vrijeme natapanja 15-30 sec.)

8. U jažicu se doda mišje antitijelo specifično za ljudsko IgG-antitijelo, 50 µL/jažici, razrijeđeno 1:16000 u diluentu za razrjeđivanje. Mikroploča se inkubira 1h na +37°C, na miješalici.
9. Mikroploče se isperu 6 puta s puferom za ispranje, 150 µl/jažici (vrijeme natapanja 15-30 sec.).
10. U jažicu se doda 50 µl/jažici pripremljen biotinil-tiramid. Mikroploča se inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi, na miješalici.
11. Mikroploče se isperu 6 puta s puferom za pranje, 150 µl/jažici (vrijeme natapanja 15-30 sec.).
12. U jažicu se doda 50 µl/jažici streptavidin konjugiran s HRP-om. Mikroploča se inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi, na miješalici.
13. Mikroploče se isperu 6 puta s puferom za pranje, 150 µl/jažici (vrijeme natapanja 15-30 sec.).
14. U jažicu se doda TMB supstrat 50µl/jažic, direktno iz hladnjaka.
15. Reakcija se zaustavlja nakon 10 min s 25 µl 1M solnom kiselinom.
16. Absorbancije se očitavaju na 450 nm (ref: 620nm).

In house imunoenzimski test - IgM

1. Oblaganje jažica antigenima izvodi se kao i kod imunoenzimskog testa za dokazivanje križne reaktivnosti s IgG-antitijelima.
2. U jažicu se doda 50 µl/jažici eluata, razrijeđeni 1:10 u diluentu za razrjeđivanje. Mikroploče se inkubiraju 4h na +37°C, na miješalici.
3. Mikroploče se isperu s 150 µl/jažici s puferom za pranje, šest puta (vrijeme natapanja 15-30 sec.)
4. U jažicu se doda mišje antitijelo specifično za ljudsko IgM-antitijelo, 50 µl/jažici, razrijeđeno 1:6000 u diluentu za razrjeđivanje. Mikroploča se inkubira 1h na sobnoj temperaturi, na miješalici.
5. Mikroploče se isperu 6 puta s puferom za ispranje, 150 µl/jažici (vrijeme natapanja 15-30 sec.).
6. U jažicu se doda 50 µl/jažici pripremljen biotinil-tyramid. Mikroploča se inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi, na miješalici.
7. Mikroploče se isperu 6 puta s puferom za ispranje, 150 µl /jažici (vrijeme natapanja 15-30 sec.).

- 8.** U jažicu se doda 50 μl /jažici streptavidin konjugiran s HRP-om. Mikroploča se inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi, na miješalici.
- 9.** Mikroploče se isperu 6 puta s puferom za pranje, 150 μl /jažici (vrijeme natapanja 15-30 sec.).
- 10.** U jažicu se doda TMB supstrat 50 μl /jažic, direktno iz hladnjaka.
- 11.** Reakcija se zaustavlja nakon 10 min s 25 μl 1M solnom kiselinom.
Absorbancije se očitavaju na 450 nm (ref: 620nm).

3.3. STATISTIČKA ANALIZA

3.3.1 Analiza razine ABO-izohemaglutinina prema kategorijama spol, dob, krvne grupe i godišnje dobi

U obradi podataka korišteni su alati deskriptivne i inferencijske statistike. Za opći uvid u grupe ispitanika svrstanih prema kategorijama koristio se tablični prikaz podataka.

Broj ispitanika prema kategorijama spol, krvne grupe i godišnje dobi izražen je apsolutnom frekvencijom, a dob medijanom i rasponom (Tablica 6). Vrijednosti razine ABO-izohemaglutinina prikazani su medijanima, interkvartilnim rangom te rasponom.

Za donošenje zaključaka o dobivenim rezultatima, koristili su se statistički testovi.

Rezultati unutar svih skupina nisu bili normalno distribuirani (Kolmogorov – Smirnovljev test $<0,05$) pa se za usporedbu rezultata razine ABO-izohemaglutinina u kategorijama krvna grupa i spol koristio Mann-Whitney test, a u kategorijama dob i godišnje dobi, radi usporedbe više skupina, koristio se Kruskal -Wallis test (76).

Kod usporedbe pojavnosti imunoglobulinskih razreda unutar pojedinih krvnih grupa koristio se Spearmanov koeficijent korelacije te regresijska analiza (77).

Za sve testove razina značajnosti zaključivanja bila je 5% ($<0,05$).

3.3.2 Analiza križne reaktivnosti ABO-izohemaglutinina i grupnih alergena

Za opći uvid u rezultate korišten je tablični prikaz za pozitivne i negativne rezultate prema imunoglobulonskim razredima i grupnim alergenima.

Rezultati su prikazani apsolutnom frekvencijom.

Pozitivni rezultati su definirani kao vrijednosti koje su veće od srednje vrijednosti ekstinicije na „blank“ pozicijama uvećane za dvije standardne devijacije.

Negativni rezultati su definirani kao vrijednosti koje su manje od srednje vrijednosti ekstinkcije na „blank“ pozicijama uvećane za dvije standardne devijacije.

4. REZULTATI

4.1. Karakteristike ABO-izohemaglutinina kod DDK prema krvnim grupama

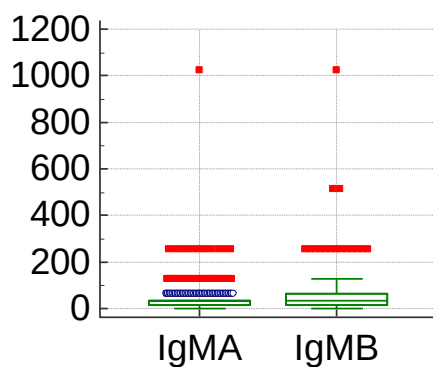
4.1.1. Usporedba razine ABO-izohemaglutinina između krvnih grupa A i B

Usporedba razine oba imunoglobulinska razreda ABO-izohemaglutinina Mann-Whitneyevim testom pokazala je postojanje statistički značajne razlike između A i B krvne grupe za oba razreda antitijela ($P=0,006$ IgM i $P=0,0002$ za IgG).

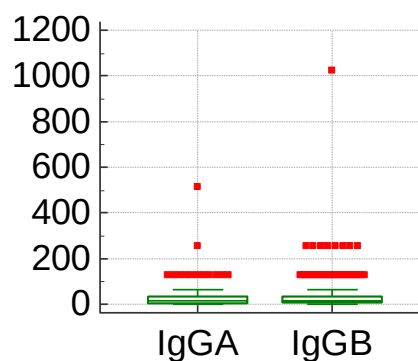
DDK krvne grupe B imaju višu razinu ABO-izohemaglutinina u usporedbi s krvnom grupom A (Slike 18, 19).

Median hemaglutinacijskog titra IgM-razreda antitijela kod krvne grupe A je 32, a interkvartilni raspon od 16 do 32, dok je kod krvne grupe B median 32 s interkvartilnim rasponom od 16 do 64 i rangom od 0 do 1024 u oba slučaja.

Median hemaglutinacijskog titra IgG-razreda antitijela kod krvne grupe A je 16, a interkvartilni raspon od 4 do 32 te rang od 0 do 512, dok je kod krvne grupe B median također 16, a interkvartilni raspon od 8 do 32 i rang od 0 do 1024.



Slika 18. Usporedba razine IgM-imunoglobulinskog razreda kod KG A i B



Slika 19. Usporedba razine IgG-imunoglobulinskog razreda kod KG A i B

4.1.2. Usporedba razine ABO-izohemaglutinina između krvnih grupa O i A i krvnih grupa O i B

Usporedba razine oba razreda ABO-izohemaglutinina Mann-Whitneyevim testom pokazala je postojanje statistički značajne razlike između krvnih grupa O i A te krvnih grupa O i B, za oba razreda antitijela ($P < 0,0001$ IgM i $P < 0,0001$ za IgG).

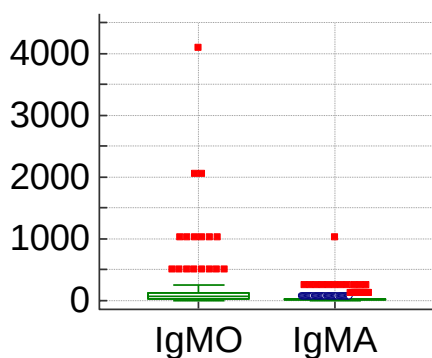
Krvna grupa O ima statistički značajno višu razinu ABO-izohemaglutinina za oba razreda antitijela u usporedbi s krvnom grupom A, kao i s krvnom grupom B (Slike 20, 21, 22, 23).

Median hemaglutinacijskog titra anti-B IgM-razreda ABO-izohemaglutinina kod krvne grupe O je 64, a interkvartilni raspon 32-128 i rang od 1 do 4096, dok je kod krvne grupe A median 32 s interkvartilnim rasponom od 16 do 32 i rangom od 0 do 1024.

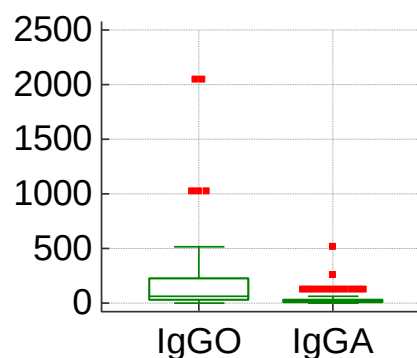
Median hemaglutinacijskog titra anti-B IgG-razreda ABO-izohemaglutinina kod krvne grupe O je 64, a interkvartilni raspon od 32 do 128, raspon od 0 do 2048, dok je kod krvne grupe A median 16 s interkvartilnim rasponom od 4 do 32 i rangom od 0 do 512.

Median hemaglutinacijskog titra anti-A IgM-razreda ABO-izohemaglutinina kod krvne grupe O je 64, a interkvartilni raspon od 32 do 128 i rang od 0 do 4096, dok je kod krvne grupe B median 32 s interkvartilnim rasponom od 16 do 64 i rangom od 0 do 1024.

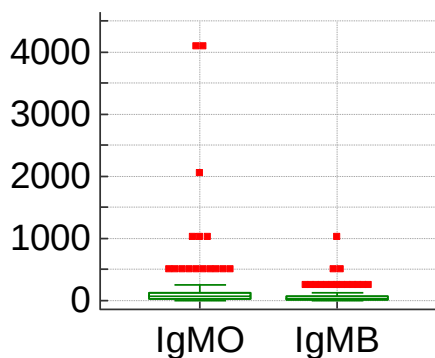
Median hemaglutinacijskog titra anti-A IgG-razreda ABO-izohemaglutinina kod krvne grupe O je 128, a interkvartilni raspon od 64 do 256 te rang od 0 do 2048, dok je kod krvne grupe B median 16 s interkvartilnim rasponom od 8 do 32 i rangom od 0 do 1024.



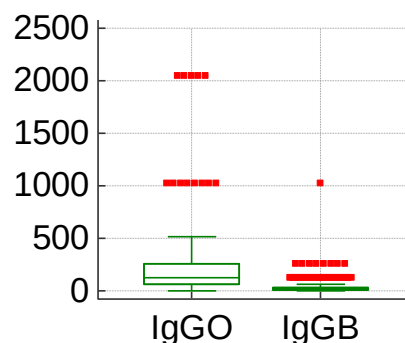
Slika 20. Usporedba razine IgM-imunoglobulinskog razreda kod KG O i A



Slika 21. Usporedba razine IgG-imunoglobulinskog razreda kod KG O i A



Slika 22. Usporedba razine IgM-imunoglobulinskog razreda kod KG O i B



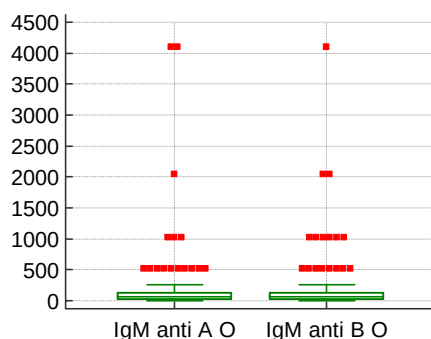
Slika 23. Usporedba razine IgG-imunoglobulinskog razreda kod KG O i B

4.1.3. Usporedba razine anti-A i anti-B izohemaglutinina kod krvne grupe O

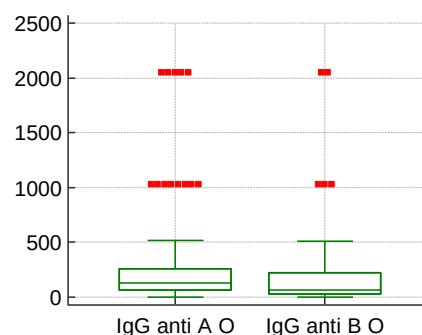
Usporedba razine IgM-razreda anti-A i anti-B izohemaglutinina kod krvne grupe O, Mann-Whitneyevim testom, pokazala je da nema statistički značajne razlike ($P=0,998$).

Usporedba razine IgG-razreda anti-A i anti-B izohemaglutinina kod krvne grupe O, Mann-Whitneyevim testom, pokazala je da postoji statistički značajna razlika ($P=0,002$).

Median hemaglutinacijskog titra za anti-A IgG-razred ABO-izohemaglutinina iznosi 128 s interkvartilnim rasponom od 64 do 256 i rangom od 0 do 2048, a za anti-B IgG-razred ABO-izohemaglutinina medijan iznosi 64 s interkvartilnim rasponom od 32 do 128 i rangom od 0 do 2048 (Slike 24,25).



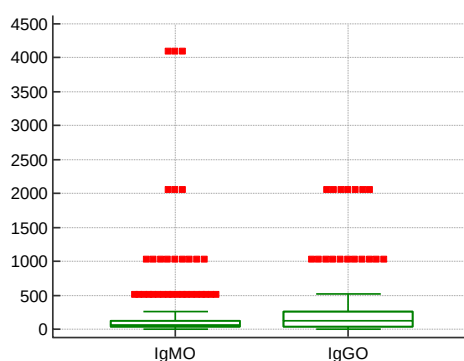
Slika 24. Usporedba razine IgM Anti-A i Anti-B kod KG O



Slika 25. Usporedba razine IgG Anti-A i Anti-B kod KG O

4.1.4. Usporedba imunoglobulinskih razreda kod krvne grupe O

Usporedba imunoglobulinskih razreda IgG i IgM ABO-izohemaglutinina kod krvne grupe O Mann-Whitneyevim testom pokazala je postojanje statistički značajne razlike ($P < 0,0001$). Razina imunoglobulinskog razreda IgG je značajno viša u odnosu na razinu IgM-razreda. Median hemaglutinacijskog titra za IgM-razred iznosi 64 s interkvartilnim rasponom od 32 do 128 i rasponom od 0 do 4096, a za IgG-razred medijan iznosi 128 s interkvartilnim rasponom od 32 do 256 i rangom od 0 do 2048 (Slika 26).

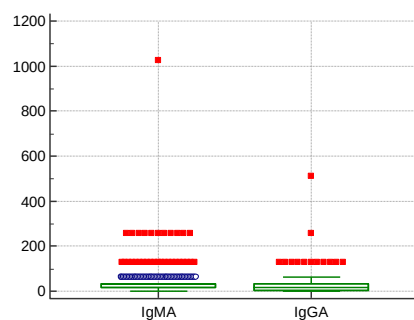


Slika 26. Usporedba razine IgG- i IgM- imunoglobulinskih razreda kod KG O

4.1.5. Usporedba imunoglobulinskih razreda kod krvne grupe A

Usporedba imunoglobulinskih razreda IgG i IgM ABO-izohemaglutinina kod krvne grupe A Mann-Whitneyevim testom pokazala je postojanje statistički značajne razlike ($P < 0,0001$). Razina imunoglobulinskog razreda IgM je značajno viša u odnosu na razinu IgG-razreda (Slika 27).

Median hemaglutinacijskog titra za IgM-razred iznosi 32 s interkvartilnim rasponom od 16 do 32 i rasponom od 0 do 1024, a za IgG-razred medijan iznosi 16 s interkvartilnim rasponom od 4 do 32 i rangom od 0 do 512.

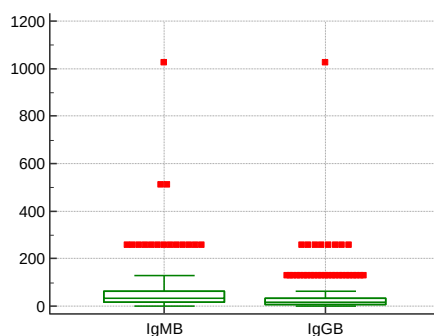


Slika 27. Usporedba razine IgG- i IgM- imunoglobulinskih razreda kod KG A

4.1.6. Usporedba imunoglobulinskih razreda kod krvne grupe B

Usporedba imunoglobulinskih razreda IgG i IgM ABO-izohemaglutinina kod krvne grupe B Mann-Whitneyevim testom pokazala je postojanje statistički značajne razlike ($P < 0,0001$). Razina imunoglobulinskog razreda IgM je značajno viša u odnosu na razinu IgG-razreda (Slika 28).

Median za hemaglutinacijski titar IgM-razreda iznosi 32 s interkvartilnim rasponom od 16 do 64 i rasponom od 0 do 1024, a za IgG-razred median iznosi 16 s interkvartilnim rasponom od 8 do 32 i rasponom od 0 do 1024.



Slika 28. Usporedba razine IgG- i IgM- imunoglobulinskih razreda kod KG B

4.1.7. Korelacijska usporedba imunoglobulinskih razreda ABO-izohemaglutinina unutar krvnih grupa

Spermanov koeficijent korelacije pokazao je vrlo dobru povezanost kretanja razine imunoglobulinskih razreda, kod svih krvnih grupa (Tablice 8, 9, 10).

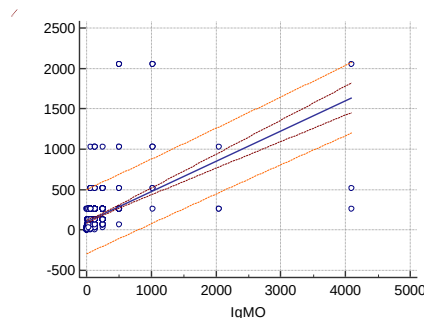
Regresijska analiza prikazana je regresijskom jednadžbom uz koeficijent determinacije (Slike 29, 30, 31).

Kod krvne grupe O, za razliku od krvnih grupa A i B, povezanost se ne može objasniti matematičkim modelom jer je koeficijent determinacije nizak, $r^2=0,24$. Linearnom porastu jedne varijable (IgM) odgovara porast druge varijable (IgG), ali je vrijednost jedne varijable povezana s više vrijednosti druge varijable.

Kod krvnih grupa A i B $r^2=0,68$ i $0,69$.

Tablica 8 . Korelacijska usporedba IgM i IgG razreda kod krvne grupe O

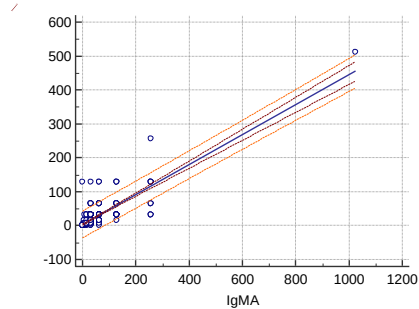
N	796
Spearmanov koeficijent korelacije	0,701(95% CI 0,664 to 0,734)
	$P<0,001$



Slika. 29 Linearna regresija IgM vs. IgG kod krvne grupe O
 $y = 104,0277 + 0,3748 x$, $r^2=0,24$

Tablica 9. Korelacijska usporedba IgM i IgG razreda kod krvne grupe A

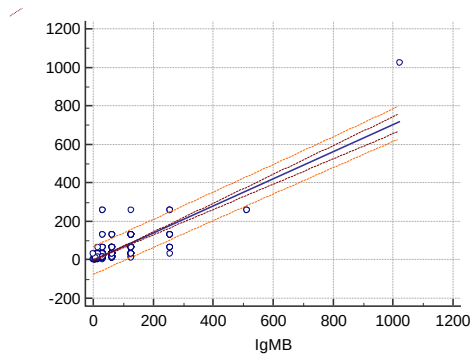
N	399
Spearmanov koeficijent korelacije	0,755 (95% CI 0,710 to 0,794)
	P<0,001



Slika 30. Linearna regresija IgM vs. IgG kod krvne grupe A
($y = 3,6621 + 0,4409 x$), $r^2=0,68$

Tablica 10. Korelacijska usporedba IgM i IgG razreda kod krvne grupe B

N	400
Spearmanov koeficijent korelacije	0,758 (95% CI 0,713 to 0,797)
	P<0,001



Slika 31. Linearna regresija IgM vs. IgG kod krvne grupe B
($y = -3,2398 + 0,7034 x$), $r^2=0,69$

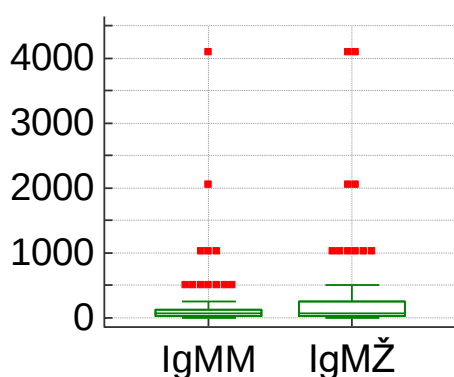
4.2. Karakteristike ABO-izohemaglutinina kod DDK prema spolu i krvnim grupama

4.2.1. Usporedba razine ABO-izohemaglutinina prema spolu kod DDK krvne grupe O

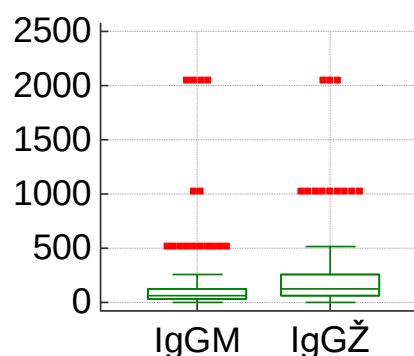
Usporedba razine IgM- i IgG- razreda ABO-izohemaglutinina Mann-Whitneyevim testom pokazala je postojanje statistički značajne razlike između muških i ženskih DDK ($P < 0,0001$ IgM i $P = 0,0005$ IgG), kod krvne grupe O. DDK krvne grupe O ženskog spola imaju višu razinu IgM- i IgG- ABO-izohemaglutinina u usporedbi s DDK krvne grupe O muškog spola (Slike 32, 33).

Median hemaglutinacijskog titra za IgM-razred kod muškaraca iznosi 64 s interkvartilnim rasponom od 32 do 128 i rasponom od 1 do 4096, kod žena medijan iznosi 64 s interkvartilnim rasponom od 32 do 256 i rasponom od 0 do 4096.

Median hemaglutinacijskog titra za IgG-razred kod muškaraca iznosi 64 s interkvartilnim rasponom od 32 do 128 i rasponom od 1 do 2048, kod žena medijan iznosi 128 s interkvartilnim rasponom od 64 do 256 i rasponom od 0 do 2048.



Slika 32. Usporedba razine IgM-imunoglobulinskog razreda muškarci vs. žene kod KG O



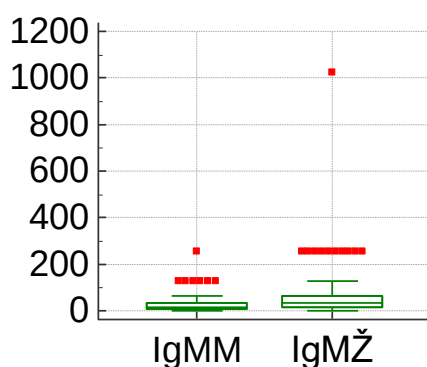
Slika 33. Usporedba razine IgG-imunoglobulinskog razreda muškarci vs. žene kod KG O

4.2.2. Usporedba razine ABO-izohemaglutinina prema spolu kod DDK krvne grupe A

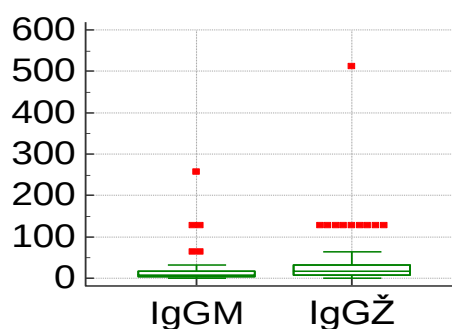
Usporedba razine IgM- i IgG- razreda ABO-izohemaglutinina Mann-Whitneyevim testom pokazala je postojanje statistički značajne razlike između muških i ženskih DDK ($P < 0,0001$ IgM i $P < 0,001$ IgG) kod krvne grupe A. DDK krvne grupe A ženskog spola imaju višu razinu IgM- i IgG- ABO-izohemaglutinina u usporedbi s DDK krvne grupe A muškog spola (Slike 34, 35).

Median hemaglutinacijskog titra za IgM-razred kod muškaraca iznosi 16 s interkvartilnim rasponom od 8 do 32 i rasponom od 0 do 256, kod žena medijan iznosi 32 s interkvartilnim rasponom od 16 do 64 i rasponom od 0 do 1024.

Median hemaglutinacijskog titra za IgG-razred kod muškaraca iznosi 8 s interkvartilnim rasponom od 4 do 16 i rasponom od 0 do 256, kod žena medijan iznosi 16 s interkvartilnim rasponom od 8 do 32 i rasponom od 0 do 512.



Slika 34. Usporedba razine IgM-imunoglobulinskog razreda muškarci vs. žene kod KG A



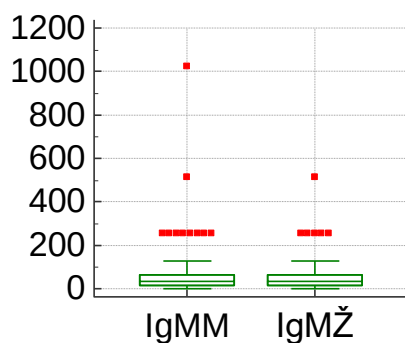
Slika 35. Usporedba razine IgG-imunoglobulinskog razreda muškarci vs. žene kod KG A

4.2.3 Usporedba razine ABO-izohemaglutinina prema spolu kod DDK krvne grupe B

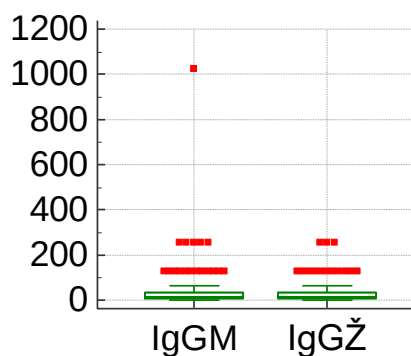
Usporedba razine IgM i IgG razreda ABO-izohemaglutinina Mann-Whitneyevim testom pokazala je da nema statistički značajne razlike između muških i ženskih DDK ($P=0,148$ IgM i $P=0,085$ IgG) kod krvne grupe B (Slike 36, 37).

Median za IgM kod muškaraca iznosi 32 s interkvartilnim rasponom od 16 do 64 i rasponom od 0 do 1024, kod žena medijan iznosi 32 s interkvartilnim rasponom od 16 do 64 i rasponom od 0 do 512.

Median za IgG kod muškaraca iznosi 16 s interkvartilnim rasponom od 8 do 32 i rasponom od 0 do 1024, kod žena medijan iznosi 16 s interkvartilnim rasponom od 8 do 32 i rasponom od 0 do 256.



Slika 36. Usporedba razine IgM- imunoglobulinskog razreda muškarci vs. žene kod KG B



Slika 37. Usporedba razine IgG- imunoglobulinskog razreda muškarci vs. žene kod KG B

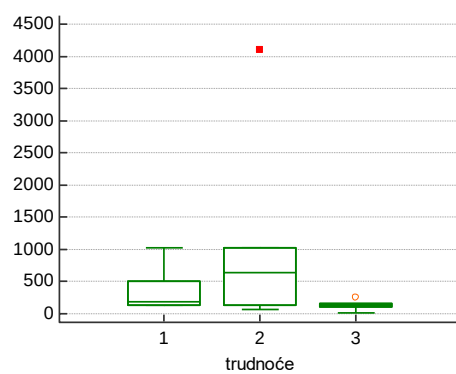
4.3. Usporedba razine ABO-izohemaglutinina kod trudnica

U izdvojenoj skupini DDK (N=41), čiji uzorci su se koristili u ispitivanju križne reaktivnosti s respiratornim alergenima, neki od DDK iz te skupine imali su jako izražen titar ABO-izohemaglutinina. Uzimanje anamnestičkih podataka o imunizacijskim epizodama izdvojile su DDK žene s trudnoćama u anamnezi.

Usporedbom razine IgM- i IgG- razreda ABO-izohemaglutinina kod trudnica Kruskal-Wallisovim testom, pokazala je da nema statistički značajne razlike za IgM- razred antitijela s obzirom na broj trudnoća, a da za IgG- razred antitijela postoji statistički značajna razlika između multipara i nulipara ($P=0,176$ IgM i $P=0,028$ IgG) (Tablica 11, 12, Slike 38, 39).

Tablica 11. Kruskal-Wallis test za IgM

TRUDNOĆE	IgM
N	23
1	1 trudnoća
2	2 i više trudnoća
3	bez trudnoće
Test	$P = 0,176$
	3,12

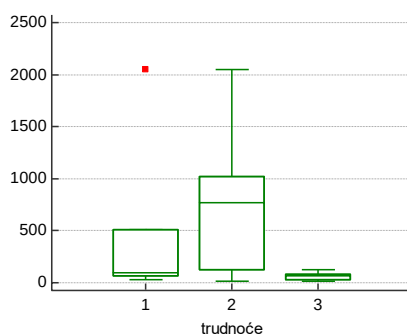


Slika 38. Usporedba razine IgM-imunoglobulinskog razreda kod trudnica

Tablica 12. Kruskal-Wallis test za IgG.

TRUDNOĆE	IgG
N	23
1	1 trudnoća
2	2 i više trudnoća
3	bez trudnoće
Test	P = 0,028
	6,97

Post hoc analiza	N	Average Rank	Razlika <0,05
1 - trudnoća	6	10,83	
2 - više trudnoća	12	15,17	(3)
3 - bez trudnoće	5	5,80	(2)



Slika 39. Usporedba razine IgG-imunoglobulinskog razreda kod trudnica

Prema izraženom titru u toj skupini ispitanika izdvojila su se dva muška DDK. Prema anamnestičkim podacima u prehrani su koristili domaće neobrađene mliječne proizvode. Njihovi titrovi su se kretali u rangu za IgM od 512 do 4096, a za IgG od 256 do 4096. Nekih drugih imunizacijskih epizoda, kao što su cijepljenje ili transfuzije u toj skupini ispitanika nije bilo.

4.4. Karakteristike ABO-izohemaglutinina kod DDK prema dobnim skupinama

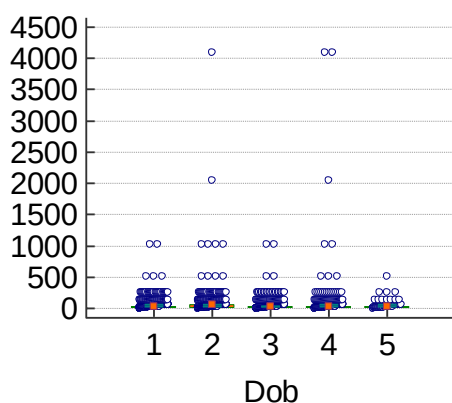
Usporedba razine IgM- i IgG- razreda ABO-izohemaglutinina Kruskal-Walisovim testom pokazala je da nema statistički značajne razlike u razini oba razreda ABO-izohemaglutinina prema dobnim skupinama ($P=0,173$ IgM i $P=0,149$ IgG) (Tablica 13, 14, Slike 40, 41).

Tablica 13. Kruskal-Wallis test za IgM

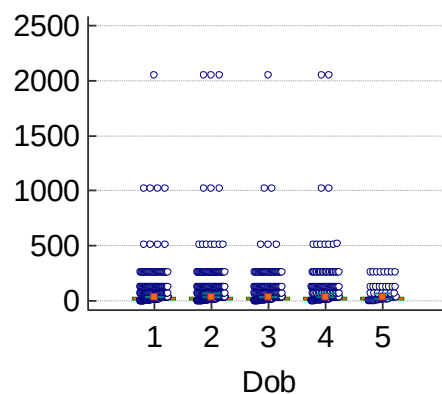
DOB	IgM	prosječne vrijednosti rangova
N	1197	
(1) 18-29	356 (30%)	605,77
(2) 30-39	311 (26%)	624,26
(3) 40-49	268 (22%)	567,29
(4) 50-59	197(16%)	609,03
(5) ≥ 60	65 (6%)	538,30
Test	P = 0,173	
	6,11	

Tablica 14. Kruskal-Wallis test za IgG

DOB	IgM	prosječne vrijednosti rangova
N	1197	
(1) 18-29	356 (30%)	567,66
(2) 30-39	311 (26%)	624,89
(3) 40-49	268 (22%)	594,27
(4) 50-59	197(16%)	622,64
(5) ≥ 60	65 (6%)	555,20
Test	P = 0,149	
	6,62	



Slika 40. Usporedba razine IgM-imunoglobulinskog razreda prema dobi



Slika 41. Usporedba razine IgG-imunoglobulinskog razreda prema dobi

4.5. Karakteristike ABO-izohemaglutinina kod DDK prema dobnim skupinama i spolu

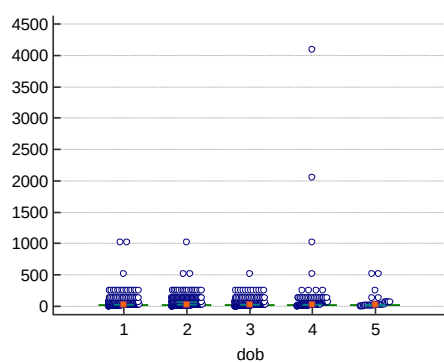
Usporedba razine IgM- i IgG- razreda ABO-izohemaglutinina prema dobnim skupinama kod muškaraca, pokazala je Kruskal-Walisovim testom je da nema statistički značajne razlike ($P=0,198$ IgM i $P=0,529$ IgG) (Tablica 15, Slika 42, 43).

Usporedba razine IgM- i IgG- razreda ABO izohemaglitinina prema dobi kod žena pokazala je Kruskal-Walisovim testom postojanje statistički značajne razlike kod IgG- razreda ABO-izohemaglutinina prema dobi ($P=0,009$). Razina IgG- razreda ABO-izohemaglutinina značajno je veća u dobnoj skupini 30-39 u odnosu na dobne skupine 18-29, 50-59 i ≥ 60 . Kod IgM- razreda nije bilo statistički značajne razlike s obzirom na dob ($P=0,129$) (Tablica 16, Slika 44, 45).

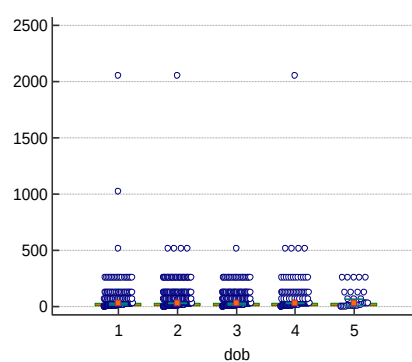
Tablica 15. Kruskal-Wallis test za IgM i IgG -muškarci

DOB/MUŠKARCI	IgM	prosječne vrijednosti rangova
N	798	
(1) 18-29	218	427,70
(2) 30-39	231	426,99
(3) 40-49	216	389,78
(4) 50-59	117	426,80
(5) ≥ 60	26	357,95
Test	$P = 0,198$	
	5,78	

DOB/MUŠKARCI	IgG	prosječne vrijednosti rangova
N	798	
(1) 18-29	218	398,53
(2) 30-39	231	424,60
(3) 40-49	216	408,79
(4) 50-59	117	437,37
(5) ≥60	26	385,17
Test	P = 0,529	
	3,11	



Slika 42. Usporedba razine IgM-imunoglobulinskog razreda prema dobi kod muškarca



Slika 43. Usporedba razine IgG-imunoglobulinskog razreda prema dobi kod muškaraca

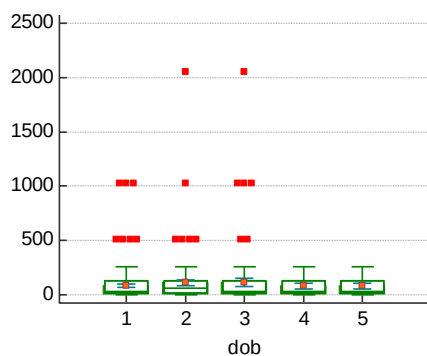
Tablica16. Kruskal-Wallis test za IgM i IgG-žene

DOB/ŽENE	IgM	prosječne vrijednosti rangova
N	797	
(1) 18-29	298	308,88
(2) 30-39	190	348,56
(3) 40-49	171	337,93
(4) 50-59	69	314,58
(5) ≥60	69	306,91
Test	P = 0,129	
	5,54	

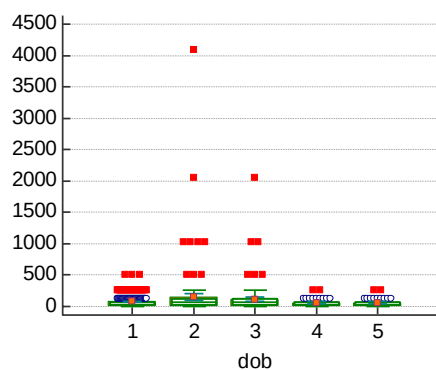
DOB/ŽENE	IgG	prosječne vrijednosti rangova
N	797	
(1) 18-29	298	338,28
(2) 30-39	190	391,49
(3) 40-49	171	360,10
(4) 50-59	69	306,91
(5) ≥60	69	306,91
Test	P = 0,009	
	12,94	

	N	Average R ank	Razlika <0,05
(1) 18-29	298	338,28	(2)
(2) 30-39	190	391,49	(1)(4)(5)
(3) 40-49	171	360,10	
(4) 50-59	69	306,91	(2)
(5) ≥60	69	306,91	(2)

Post hoc analiza



Slika 44. Usporedba razine IgM-imunoglobulinskog razreda prema dobi kod žena



Slika 45. Usporedba razine IgG-imunoglobulinskog razreda prema dobi kod žena

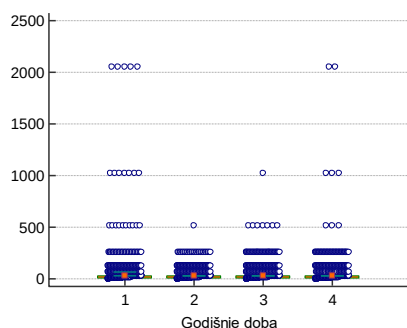
4.6. Karakteristike ABO-izohemaglutinina kod DDK prema godišnjim dobima

Usporedba razine IgM- i IgG- razreda ABO-izohemaglutinina Kruskal-Walisovim testom pokazala je da nema statistički značajne razlike u razini oba razreda ABO-izohemaglutinina s obzirom na utjecaj godišnjih doba ($P=0,410$ IgM i $P=0,098$ IgG) (Tablica 17, Slika 46, 47).

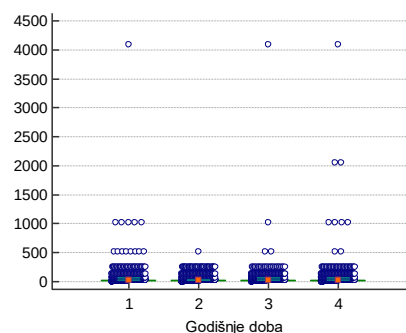
Tablica 17. Kruskal-Wallis test za IgM i IgG

GODIŠNJA DOBA	IgM	prosječne vrijednosti rangova
N	797	
(1) proljeće	400	811,27
(2) jesen	398	765,67
(3) zima	400	801,33
(4) ljeto	397	813,68
Test	P = 0,410	
	2,77	

GODIŠNJA DOBA	IgG	prosječne vrijednosti rangova
N	797	
(1) proljeće	400	821,63
(2) jesen	398	748,64
(3) zima	400	811,63
(4) ljeto	397	807,99
Test	P = 0,098	
	6,16	



Slika 46. Usporedba razine IgG-imunoglobulinskog razreda prema godišnjim dobima



Slika 47. Usporedba razine IgM-imunoglobulinskog razreda prema godišnjim dobima

4.7. Rezultati analize križne reaktivnosti IgM- i IgG- razreda ABO-izohemaglutinina s grupnim alergenima trava (mješavina 1 i 2), korova (mješavina 3) i stabala (mješavina 4).

U tablicama 18 i 19 prikazani su rezultati analize križne reaktivnosti IgM- i IgG- antitijela i pojedinačnih grupnih alergena.

Granična vrijednost koja čini distinkciju pozitivnog i negativnog rezultata je vrijednost određena iz srednjih vrijednosti ekstincija za „blank“ (jažice bez eluata) i dvostruke standardne devijacije tih vrijednosti.

Pozitivni uzorci su uzorci čija je reaktivnost veća od granične vrijednosti u sva tri testa.

Negativni uzorci su uzorci čija reaktivnost je manja od granične vrijednosti u sva tri testa.

Nejasni rezultati podrazumijevaju očitu diskrepancu jednog od tri rezultata.

Greške su situacije koje se dovode u vezu s greškama u pipetiranju u bilo kojoj fazi testa. Takve okolnosti dovode do izrazito slabih reaktivnosti u odnosu na ostala dva rezultata.

Tablica 18. Rezultati analize križne reaktivnosti IgM-antitijela i pojedinačnih grupnih alergena

IgM	Pozitivni	Negativni	Nejasni	Greška
Trave, mješavina 1	37	2	2	0
Trave, mješavina 2	27	1	11	2
Korovi, mješavina 3	32	2	7	0
Stabla, mješavina 4	33	0	7	1

Tablica 19. Rezultati analize križne reaktivnosti IgG-antitijela i pojedinačnih grupnih alergena

IgG	Pozitivni	Negativni	Nejasni	Greška
Trave, mješavina 1	32	0	9	0
Trave, mješavina 2	27	4	10	0
Korovi, mješavina 3	32	0	9	0
Stabla, mješavina 4	38	3	0	0

5. RASPRAVA

U ovom radu ispitano je 1197 DDK sa svrhom razumijevanja koje osobe prema ABH-antigenom statusu i koje kategorije te njihove kombinacije nose značajan rizik od klinički značajnog titra ABO-izohemaglutinina. U ispitivanju su obuhvaćena oba spola, dobne skupine od 18 do 65 godina, svi godišnji periodi i krvne grupe iz sustava ABO.

Radi razumijevanja utjecaja pojedinih kategorija na aktivnost i razinu ABO-izohemaglutinina ovaj rad je obuhvatio različite aspekte.

Usporedba razine IgM- i IgG- imunoglobulinskih razreda ABO-izohemaglutinina, u ovom radu, pokazala je postojanje statistički značajne razlike između krvne grupe A i B, za oba imunoglobulinska razreda ($P=0,006$ IgM i $P=0,0002$ za IgG). DDK krvne grupe B imaju višu razinu ABO-izohemaglutinina u usporedbi s krvnom grupom A.

Krvna grupa O ima statistički značajno višu razinu ABO-izohemaglutinina za oba imunoglobulinska razreda ($P<0,001$ IgM i $P<0,001$ za IgG) u usporedbi s krvnom grupom A, kao i s krvnom grupom B ($P<0,001$ IgM i $P<0,001$ za IgG).

Rezultati titra i međusobnih odnosa ABO-izohemaglutinina prema krvnim grupama dobiveni na reprezentativnom uzorku populacije DDK odgovaraju podacima iz literature. Prema Anstee i Kleinu raspon titra za anti-A iznosi od 8 do 2048, a za anti-B od 8 do 256, a prema Fungu od 4 do 2048 (29) (30). Romphruk (54) je u svom radu objavio raspone u titru kod krvne grupe O od 4 do 1024. Bazioglu (74) je ispitao 70 DDK krvne grupe O. Median za anti-A iznosio je 64 s rasponom od 2 do 1024, dok je za anti-B iznosio 32 s rasponom od 2 do 256. Slične rezultate su dobili Quillen i suradnici (44). Karafin (75) je objavio ($N=620$) da je median titra kod krvne grupe O za anti-A 128 s rasponom od 1 do 1028, a za anti-B 32 s rasponom od 4 do 1024.

Ova skupina rezultata je slična rezultatima dobivenim ovim istraživanjem.

Uspoređujući dobivene rezultate titrova s rezultatima Cooling i sur. (46) opaža se razlika u medijanima. Medijani hemaglutinacijskih titrova ABO-izohemaglutinina, svih krvnih grupa, iz ovog rada bili su viši za 1-2 razrjeđenja. Dobiveni rasponi titrova ABO-izohemaglutinina za oba imunoglobulinska razreda i kod svih krvnih grupa, znatno su viši u ovom radu, u odnosu na raspone iz Coolingine studiju. Bitne razlike u rasponima su vjerojatno rezultat malog uzorka $N=25$ za A krvnu grupu, $N=26$ za B krvnu grupu te $N=124$ za krvnu grupu O.

Usporedba razine IgM- imunoglobulinskih razreda anti-A i anti-B izohemaglutinina unutar krvne grupe O, pokazala je da nema statistički značajne razlike $P=0,998$.

Usporedba razine IgG- imunoglobulinskih razreda anti-A i anti-B izohemaglutinina unutar krvne grupe O, pokazala postojanje statistički značajne razlike $P=0,002$.

Razina anti-A antitijela IgG-razreda je značajno veća od razine anti-B antitijela kod krvne grupe O, kao što je i kod krvne grupe B viša razina anti-A izohemaglutinina u usporedbi s anti -B antitijelima kod krvne grupe A. Moguće objašnjenje leži u češćoj prisutnosti A supstance u okolini (2), kao na primjer, supstanca slična A antigenu prisutna je u mnogim cjepivima (10). Rezultati razine IgM- i IgG- imunoglobulinskih razreda iz ovog rada, unutar krvne grupe O, pokazali su postojanje statistički značajne razlike $P<0,0001$. Razina imunoglobulinskog razreda IgG je značajno viša u odnosu na razinu IgM.

Kay i Locke smatraju da osobe krvne grupe O proizvode IgG antitijela češće od ostalih, zbog većeg antigenog disariteta između krvne grupe O i krvnih grupa A ili B, nego što je to disaritet između krvne grupe A i krvne grupe B. Tako nastaje *class swiching* i proizvodnja IgG-razreda antitijela u puno većoj mjeri nego kod A i B krvne grupe.

IgG-razred ABO-izohemaglutinina utvrđen je u radu Stussi i sur. kod 89% osoba s krvnom grupom O, dok je kod krvne grupe A i kod krvne grupe B taj razred zastupljen u puno manjoj mjeri, sa 4% i 14% (25).

Rezultati iz ovog rada pokazuju da je IgG-razred očekivano prisutan u visokom postotku, kod krvne grupe O (99,87%), ali isto vrijedi i za krvne grupe A (96,2%) i B (99,5%). Ti se rezultati razlikuju od literaturnih podataka (25), a mogući razlog tome mogu biti vanjski čimbenici ili razlika u detekcijskom kapacitetu korištenih metoda.

Koeficijent korelacije ($\rho=0,70$) ukazuje na vrlo dobru linearnu povezanost kretanja oba razreda antitijela kod krvne grupe O, ali jačina povezanosti je slaba, $r^2=0,24$. To znači, da se regresijska jednadžba kao analitički izraz koji u smislu prosjeka opisuje odnos između vrijednosti titrova oba razreda izohemaglutinina, odnosi samo na 24% rezultata. U tom pogledu, regresijska jednadžba neće poslužiti predviđanju razine antitijela jednog razreda uz poznatu vrijednost drugog razreda antitijela.

Taj podatak je bitan za donošenje odluke o opsegu ispitivanja ABO-izohemaglutinina prilikom pretraživanja davatelja u prijetransfuzijskom ispitivanju. Rezultati iz ovog rada potvrđuju da se u osoba krvne grupe O moraju ispitati razine oba imunoglobulinska razreda.

Kod krvnih grupa A i B, usporedbom razina imunoglobulinskih razreda IgG i IgM, u ovom radu, dokazana je statistički značajna razlika $P<0,0001$. Suprotno od krvne grupe O, razina

IgM-razreda antitijela je značajno viša u odnosu na razinu IgG-razreda, kod obje krvne grupe. Koeficijenti korelacije ($\rho=0,75$ i $0,76$) ukazuju na vrlo dobru linearnu povezanost oba razreda. Jačina povezanosti je jako dobra, $r^2=0,68$ i $0,69$, što znači da se regresijska jednadžba odnosi na skoro 70% rezultata te da bi se titar jednog razreda moglo predvidjeti temeljem regresijske jednadžbe uz poznatu vrijednost titra drugog razreda.

Usporedba razine IgM- i IgG- imunoglobulinskih razreda ABO-izohemaglutinina prema spolu, u ovom istraživanju pokazala je postojanje statistički značajne razlike između muških i ženskih DDK kod krvnih grupa O i A ($P<0,001$ IgM i $P<0,001$ IgG). DDK ženskog spola imaju višu razinu oba imunoglobulinska razreda ABO-izohemaglutinina u usporedbi s DDK muškog spola, dok je kod krvne grupe B usporedba razine IgM- i IgG- razreda ABO- izohemaglutinina pokazala da nema statistički značajne razlike prema spolu ($P=0,148$ IgM i $P=0,085$ IgG).

Rezultati kod krvnih grupa O i A su očekivani, jer su žene u imunizacijskom smislu više opterećene, prvenstveno zbog trudnoća i drugih imunizacijskih epizoda kao što su pobačaji i amniocenteze. Kod krvne grupe B izostanak razlike mogao bi se objasniti s moguće manjim brojem DDK ženskog spola s imunizacijskim epizodama u anamnezi.

Uspoređujući razinu ABO-izohemaglutinina među davateljicama s trudnoćom/ama u anamnezi i bez nje dokazana je statistički značajna razlika između multipara i nulipara za IgG-razred antitijela ($P=0,029$). Za IgM-razred ABO-izohemaglutinina nije dokazana statistički značajna razlika ($P=0,176$). Ova statistička analiza rađena je na uzorku ženskih DDK iz izdvojene skupine DDK.

Dobiveni rezultati potvrđuju da imunizacijske epizode u obliku trudnoće potiču sekundarni imunološki odgovor i produkciju IgG razred antitijela (69).

Ispitivanja Tendulkara (72) pokazala su statistički značajnu razliku među spolovima i prema dobi. Kod žena u dobi većoj od 40 godina primjećuje se trend porasta razine izohemaglutinina, što se povezuje s brojem trudnoća. Razliku prema spolu dokazao je i Denomme (69) na brazilskoj populaciji. Suprotno, Sood i suradnici (70) u svojoj studiji nisu dokazali povezanost spola i razine izohemaglutinina ($p=0,215$), kao što to nije dokazao niti Rieben (28). Raznolikost u dobivenim rezultatima moguće su posljedica ili slabije reprezentativnosti uzoraka ili utjecaj etniciteta i vanjskih čimbenika.

Usporedba razine IgM- i IgG- razreda ABO-izohemaglutinina prema dobnim skupinama, u ovom istraživanju nije pokazala statistički značajnu razliku u razini oba razreda ABO-izohemaglutinina ($P=0,173$ IgM i $P=0,149$ IgG).

Kada se utjecaj dobi analizirao prema spolu, tada je uočena razlika u IgG-razredu antitijela kod žena ($P=0,009$). Žene u dobnoj skupini 30-39 imaju statistički značajno viši titar u odnosu na dobne skupine 18-29, 50-59 i >60 . Između dobničkih skupina 30-39 i 40-49 nema statistički značajne razlike. U muškaraca nije uočena razlika niti u jednoj dobnoj skupini, za oba razreda ABO-izohemaglutinina ($P=0,149$ i $P=0,529$).

Očito je da je kod muških DDK imunološki sustav jednako aktivan u svim dobničkim skupinama, a kod ženskih DDK srednje dobi do izražaja dolazi imunizacijsko opterećenje trudnoćama.

De Franca je u svom radu dokazao da titar ABO-izohemaglutinina pada s dobi te da je titar kod muških DDK znatno niži u dobi iznad 50 godina u odnosu na mlađe dobne skupine muških DDK. (22) Bazioglu je pokazao da dob u grčkoj populaciji DDK nije diferencijalni čimbenik u razini titra ABO-izohemaglutinina (74). Raznolike rezultate razina ABO-izohemaglutinina prema dobi navodi i Fung (30).

Zbog svojih karakteristika, transfuzija krvnih pripravaka usporediva je s transplantacijom tkiva u malom. U taj koncept najbolje se uklapa transfuzija koncentrata trombocita. S jedne strane postoje stanice s antigenim mozaikom, a s druge, antitijela u plazmi pripravka i u plazmi primatelja. Sve komponente imaju potencijal izražen u formi serološke i imunološke reakcije. Pregledom literaturnih podataka, najcitiranije vrijednosti kritičnih titrova, za transfuzije ABO-nepodudarnih koncentrata trombocita, za IgM razred antitijela iznosi ≥ 64 , a za IgG ≥ 128 (74, 75).

Prema tim kriterijima i prema rezultatima iz ovog rada, 67% DDK krvne grupe O ima visoki titar za IgM i 51% za IgG. Kod krvne grupe A, 22% DDK ima visoki titar za IgM i 3,3% za IgG, dok je kod krvne grupe B 32% visokog titra za IgM i 8% za IgG razred.

Rezultati ispitivanja koje su proveli Cooling i sur. podudaraju se s rezultatima iz ovog rada. U njihovom ispitivanju, 60% DDK ima visok titar za IgM razred ABO-izohemaglutinina, ako je granični titar postavljen na ≥ 64 (46). Romphruk je ispitao 107 DDK krvne grupe O. 78,5% DDK imalo je visok titar za IgM-razreda kod graničnog titra postavljenog na ≥ 64 (54). Josephson je ispitivanjem na 100 DDK, krvne grupe O, izračunao da 28% DDK ima visok titar izohemaglutinina, što je bitno manje u odnosu na prethodna dva rada i rezultate iz ovog rada (46). Mogući razlozi su u korištenoj metodi i reprezentativnosti uzoraka.

Rezultati iz ovog rada pružaju široku sliku o karakteristikama ABO-izohemaglutinina u zdravoj populaciji RH. Na osnovi tih rezultata mogu se donijeti zaključci kojima bi se unaprijedila dosadašnja praksa u transfuzijskim službama u RH.

Pripravci koncentrata trombocita mogu se proizvesti na više načina. Različite metode proizvodnje u konačnici dovode do raznolikih pripravaka s obzirom na volumen plazme. Različiti pripravci koncentrata trombocita izražavaju različite rizike za pojavu AHTR-a.

Kod primjene ostalih vrsta krvnih pripravaka rizici su minimalni. Eritrocitni koncentratu sadrže zanemarivu količinu plazme, od 7 do 12 ml, a prijetransfuzijsko ispitivanje podudarnosti isključuje ABO antigenu nepodudarnost. Svježe smrznuta plazma (SSP) i intravenozni gamaglobulin (IVIG) rijetko mogu izazvati reakcije jer se SSP rijetko daje izvan ABO krvno grupe podudarnosti, a IVIG-u je propisom *Europske farmakopeje (Ph.Eur.)* i *Food and Drug Administration (FDA)* određen granični titar ABO-izohemaglutinina, < 64 (1, 42).

Temeljeno na rezultatima iz ovog rada, više od polovice pripravaka koncentrata trombocita, krvne grupe O, dobivenih aferezom od jednog davatelja, imao bi titar ABO-izohemaglutinina viši od graničnog titra. Volumen plazme u takvim pripravcima iznosi od 280 do 300 ml. U slučaju ABO-nepodudarnih transfuzija koncentrata trombocita postojao bi objektivan rizik od AHTR-e. Rizik bi posebno bio naglašen kod novorođenčadi, pedijatrijske populacije te kod bolesnika koji bi primili veće volumene ABO-nepodudarnih pripravaka.

Uz te kategorije, rizik se dodatno povećava kod primatelja A krvne grupe. Razlog tome je izražena brojnost A antigena, koja je povezana s prisutnošću svih tipova prekursorskih lanaca na membrani eritrocita u osoba A krvne grupe.

Proizvodnja koncentrata trombocita u hranjivoj otopini sve više postaje standard. Međutim, i takvim načinom redukcije plazme, zaostaje određena kritična količina plazme.

Ukoliko se u postupku afereze primjeni redukcija plazme korištenjem hranjive otopine, tada bi postotak pripravaka s titrom ABO-izohemaglutinina višim od graničnog bio znatno manji. U obzir bi se morao uzeti faktor razrjeđenja od 1:3. Ostatni volumen plazme u toj vrsti pripravaka KT kreće se od 90 do 110 ml. Tako bi svega 20% pripravaka krvne grupe O imalo visoki titar ABO-izohemaglutinina za IgM-imunoglobulinski razred i 5% za IgG- razred. Kod A- i B- krvnih grupa udio visokog titra je općenito manji, a uključivanjem faktora razrjeđenja od 1:3 iznosio bi svega 3% za pripravke krvne grupe A i 4% za pripravke krvne grupe B.

Iako se redukcijom plazme primjenom hranjive otopine povećava udio DDK koji zadovoljavaju kriterije graničnog titra i dalje ostaje problem dijela DDK s izrazito visokim titrovima.

Da postoje takvi DDK dokazano je ispitivanjima u ovom radu, i to kod svih krvnih grupa, u oba spola i u svim dobnim skupinama. U tim situacijama niti faktor razrjeđenja neće utjecati na razinu titra u konačnom pripravku.

Literaturni podaci govore o izrazito visokim titrovima koji su u takvim slučajevima doveli do AHTR-e, 1: 600 (72), 1: 16 384 (8, 49), >32 000 (46), 1: 512 (75).

Rezultati iz ovog rada mogli bi biti smjernice o opsegu prijetransfuzijskog ispitivanja ABO-izohemaglutinina. Upućuju na potrebu ispitivanja razine ABO-izohemaglutinina prilikom primjene ABO-nepodudarnih transfuzija koncentrata trombocita dobivenih aferezom u hranjivoj otopini. Prije svega kod novorođenčadi, pedijatrijske populacije te kod bolesnika koji bi primali veće volumene ABO-nepodudarnih pripravaka.

Ukoliko bi se razina ABO-izohemaglutinina ispitivala iz uzorka pripravka koncentrata trombocita dobivenih aferezom u hranjivoj otopini, tada bi se kritični titar ABO-izohemaglutinina trebao postaviti na ≥ 64 za IgM i ≥ 128 za IgG. Ako bi se razina ABO-izohemaglutinina određivala iz krvi DDK, onda bi se dozvoljeni kritičan titar, zbog faktora razrjeđenja 1:3, mogao postaviti na ≥ 256 za IgM i ≥ 512 za IgG.

Koncentrati trombocita proizvedeni iz četiri trombocitno-leukocitna međusloja (od engl. *buffy coat*), prema uvriježenom mišljenju, nose manji rizik za razvoj AHTR-e u odnosu na koncentrate trombocita dobivenih aferezom (49, 53). Takvo razmišljanje je neutemeljeno, jer čimbenik razrjeđenja doze svježe smrznute plazme (SSP) volumena 200 ml kao sastavnog dijela pripravka, iznosi svega 1:0,6. Manji broj opisanih AHTR-a, u tom slučaju je, prije svega, rezultat prakse u kojoj se takvi pripravci ne transfundiraju novorođenčadi, pedijatrijskim bolesnicima i hematološkim bolesnicima, radi nastojanja neopterećivanja tih bolesnika s antigenima većeg broja različitih davatelja.

Ukoliko bi se takvi pripravci transfundirali navedenim skupinama bolesnika, kritični titar ABO-izohemaglutinina u DDK trebao bi se postaviti na ≥ 64 za IgM i ≥ 128 za IgG.

Prema rezultatima iz ovog rada, znatan je udio DDK s visokim titrom, 67% IgM i 51%- IgG, kod O krvne grupe i nešto manji kod krvnih grupa A i B, 22% i 32%. U tom slučaju bit će otežan izbor i odabir koncentrata trombocita s dozvoljenom razinom ABO-izohemaglutinina.

Ukoliko se kod koncentrata trombocita proizvedenih iz četiri trombocitno-leukocitnih međuslojeva primjeni redukcija plazme primjenom hranjive otopine, tada ostatni volumen plazme, iz četiri međusloja, iznosi svega cca 60-80 ml. U tom slučaju, faktor razrjeđenja pojedine doze je oko 1:10 do 1:13. Koncentrati trombocita proizvedeni na taj način su sigurni i nije potrebno određivati razinu ABO-izohemaglutinina.

Transfuzijske službe koje u slučaju ABO-nepodudarnih transfuzija koncentrata trombocita proizvode koncentrate trombocita s malim volumenom plazme, koji je reduciran centrifugiranjem, morale bi zbog ostatnog volumena plazme određivati titar ABO-izohemaglutinina u DDK, prije svega kod rizičnih skupina bolesnika. Ostatni volumeni plazme kod takvih pripravaka iznose od 70 do 90 ml. Prema literaturnim podacima, volumeni koji su uzrokovali neke od AHTR iznosili su svega 15 ml, 35 ml, 37ml i 50 ml. Razlog za AHTR-e bile su razine ABO-izohemaglutinina, koje su bile znatno iznad kritičnih vrijednosti (8, 45).

Prema rezultatima iz ovog rada idealan DDK za pripravu trombocitnih pripravaka kod ABO-nepodudarnih transfuzija koncentrata trombocita je DDK muškog spola, bez obzira na dobnu skupinu, krvne grupe non-O, neopterećen anamnestičkim podacima o imunizacijskim epizodama.

Prema spolu, DDK muškog spola bez obzira na dobnu skupinu, bolji su izbor u odnosu na DDK ženskog spola. Razlog tome je značajno viši titar ABO-izohemaglutinina u žena u odnosu na muškarce ($p < 0.001$). Posebno se to odnosi na žene u dobi od 30-39 godina. One čine skupinu DDK koja izražava značajno viši titar u odnosu na ostale dobne skupine kod ženskih DDK, a posebno ako se radi o davateljicama koje u anamnezi imaju više od jedne trudnoće.

Koncentrati trombocita krvne grupe O općenito su najlošiji izbor kod ABO-nepodudarnih transfuzija koncentrata trombocita. Ne bi se smjeli transfundirati primatelju krvne grupe A, zbog izražene antigeničnosti i zbog značajno više razine anti-A izohemaglutinina u odnosu na ostale krvne grupe. Zbog niže razine anti-B izohemaglutinina, bolji je izbor koncentrat trombocita krvne grupe A u odnosu na krvnu grupu O, ako je primatelj krvne grupe B.

Isto vrijedi i kod primatelja krvne grupe AB. U slučaju ABO-nepodudarnih transfuzija koncentrata trombocita, bolji izbor od koncentrata trombocita krvne grupe O su koncentrati trombocita krvne grupe A i potom krvne grupe B. Razlog je značajno niža razina ABO-izohemaglutinina u odnosu na koncentrate trombocita krvne grupe O.

Iz navedenog, prilikom odabira pripravka koncentrata trombocita važno je voditi računa o svim navedenim činjenicama.

Uzimanje anamnestičkih podataka o prehrambenim navikama, u smislu uzimanja probiotika, nepasteriziranih mliječnih proizvoda i druge sirove hrane, trebalo bi postati sastavni dio pregleda DDK koji pristupaju aferezama. U izdvojenoj skupini DDK, čiji uzorci su se koristili u ispitivanju križne reaktivnosti s respiratornim alergenima, neki od DDK iz te skupine imali

su jako izražen titar ABO-izohemaglutinina. To su bile DDK ženskog spola s više od jedne trudnoće u anamnezi i muški DDK, koji su u prehrani koristili domaće neobrađene mliječne proizvode. Njihovi titrovi su se kretali u rangu za IgM od 512 do 4096, a za IgG od 256 do 4096.

ABO-izohemaglutinini imaju važnu ulogu i kod ABO-nepodudarnih transplantacija organa, osobito bubrega. Imunološka barijera koju čine u tom slučaju, od presudne je važnosti za uspješan ishod postupka. Njihova brza i točna detekcija uoči transplantacije i praćenje nakon transplantacije te posljedično prijetransplantacijsko i posttransplantacijsko uklanjanje važno je u predviđanju i preveniranju mogućih hiperakutnih i akutnih imunoloških reakcija. Prihvatljiv raspon titra varira od 1:4 do 1:64 i ovisi o imunosupresivnim protokolima pojedinih centara (58, 59, 70).

Uslijed velikih inter- i intra- laboratorijskih varijacija u rezultatima hemaglutinacijskih titrova ABO-izohemaglutinina javila se potreba za uspostavom metode koja bi bila opće prihvaćena. Za potrebe ovog rada standardizirana je metoda za kvantifikaciju ABO-izohemaglutinina. Standardizacija je provedena sudjelovanjem u pilot studiji *Pilot exercise for titration of anti-A and anti-B u organizaciji UK NEQAS Hematology and Transfusion*.

Primjena metode mikroaglutinacije u gel kolonama omogućila bi i do tri puta bržu te osjetljiviju i reproducibilniju detekciju ABO-izohemaglutinina za potrebe prijetransplantacijskog i posttransplantacijskog praćenja razine ABO-izohemaglutinina i prijetransfuzijskog probira DDK.

Tijekom vremena, nakupili su se čvrsti dokazi koji upućuju na povezanost okoline i nastanka izohemaglutinina. Te činjenice se temelje na širokoj rasprostranjenosti krvno-grupno specifičnih antigena u životinjskom i biljnom svijetu što rezultira sveopćoj prisutnosti u hrani kao i u česticama zraka.

U ovom radu usporedila se serološka sličnost između nekih biljnih supstanci i krvnih grupa ABO. Pretpostavka o komparabilnoj antigeničnosti ABO-krvnih grupa i polena trava, korova i stabala, prema dosadašnjim saznanjima nije potvrđena.

Ispitivanjem utjecaja godišnjih doba, odnosno povezanosti koncentracije alergena trava, korova i stabala na pojavnost i razinu ABO-izohemaglutinina te ispitivanjem križne reaktivnosti ABO-izohemaglutinina eluiranih s eritrocita i respiratornih alergena nastojalo se utvrditi jedno od mogućih objašnjenja etiologije ABO-izohemaglutinina.

Usporedba razine IgM- i IgG- razreda ABO-izohemaglutinina, u ovom radu, pokazala je da nema statistički značajne razlike u razini oba razreda ABO-izohemaglutinina s obzirom na utjecaj godišnjih doba ($P=0,410$ IgM i $P=0,098$ IgG).

Distinkcija godišnjih doba je određena kalendarski. Jesenski period stoga, obuhvaća kraj rujna, cijeli listopad i studeni te veći dio prosinca. To je dio godine, tijekom kojeg, osim na početku, alergenskih čestica u zraku gotovo i nema. Iako nije dokazana statistički značajna razlika, iz vrijednosti rezultata se vidi da je titar ABO izohemaglutinina kod DDK uzorkovanih u jesen u prosjeku niži od ostalih što može biti u vezi s utjecajem respiratornih alergena i produkcijom ABO-izohemaglutinina.

Neposredan dokaz o povezanosti alergena i ABO-izohemaglutinina je postojanje križne reaktivnosti između antigenih struktura peludnih alergena i elucijom izdvojenih ABO-izohemaglutinina.

Za određivanje križne reaktivnosti ABO-izohemaglutinina s respiratornim alergenima prilagođen je *in house* imunoenzimski test. Korištene su četiri skupine respiratornih peludnih antigena, koji su najčešće zastupljeni u našem okolišu.

Kod ispitivanja križne reaktivnosti IgM-razreda ABO-izohemaglutinina dobiven je visok postotak pozitivnih rezultata za sve četiri skupine: trave-skupina I - 90%, trave-skupina II- 65%, korovi-skupina III -78% i stabla-skupina IV-80%.

Kod ispitivanja križne reaktivnosti IgG-razreda ABO-izohemaglutinina dobiveni su također visoki postoci pozitivnih rezultata: trave-skupina I - 78%, trave-skupina II- 65%, korovi-skupina III – 76% i stabla- skupina IV - 93%.

Iz ovih rezultata može se zaključiti da su ABO-izohemaglutinini većine DDK iz skupine ispitanika križno reaktivni sa širokom lepezom respiratornih antigena.

U sva tri testa 4% uzoraka za IgM razred i 5% uzoraka za IgG razred bilo je negativno te se može zaključiti da kod tih DDK ne postoji križna reaktivnost prema respiratornim alergenima. Ovi rezultati govore u prilog komparabilnoj antigeničnosti ABO-krvnih grupa i polena trava, korova i stabala i potvrđuju imunogenetičku hipotezu o nastanku ABO-izohemaglutinina.

6. ZAKLJUČCI

1. DDK krvne grupe O imaju statistički značajno višu razinu ABO- izohemaglutinina za oba razreda antitijela u usporedbi s krvnom grupom A i krvnom grupom B.
2. DDK krvne grupe B imaju statistički značajno višu razinu ABO-izohemaglutinina za oba razreda antitijela u usporedbi s krvnom grupom A.
3. Razina IgG-razreda ABO-izohemaglutinina, kod krvne grupe O, statistički je značajno viša o odnosu na IgM-razred.
4. Razina IgM-razreda ABO-izohemaglutinina, kod krvnih grupa A i B statistički je značajno viša o odnosu na IgG-razred.
5. Razina anti-A antitijela IgG-razreda je značajno veća od razine anti-B antitijela kod krvne grupe O.
6. Kod krvnih grupa O i A u DDK ženskog spola značajno je viša razina IgM- i IgG- ABO-izohemaglutinina u odnosu na DDK muškog spola, dok kod krvne grupe B nema statistički značajne razlike.
7. Razina IgG-razreda ABO-izohemaglutinina statistički je značajno viša kod multipara u odnosu na nulipare. Za IgM-razred ABO-izohemaglutinina nije dokazana statistički značajna razlika.
8. Analizom utjecaja dobi uočena je statistički značajna razlika u žena dobne skupine od 30 do 39 u odnosu na dobne skupine 18-29, 50-59 i >60. U muškaraca nije uočena razlika niti u jednoj dobnoj skupini, za oba razreda ABO-izohemaglutinina.
9. Idealan DDK za pripravu trombocitnih pripravaka kod ABO-nepodudarnih transfuzija koncentrata trombocita je DDK muškog spola, bez obzira na dobnu skupinu, krvne grupe non-O, neopterećen anamnestičkim podacima o imunizacijskim epizodama.
10. Primjena standardizirane metode mikroaglutinacije u gel kolonama omogućuje bržu i pouzdaniju detekciju ABO-izohemaglutinina za potrebe prijetransplantacijskog i posttransplantacijskog praćenja razine ABO-izohemaglutinina i prijetransfuzijskog probira DDK.
11. Analizom sezonske aktivnosti pojedinih alergenskih supstanci na razinu ABO-izohemaglutinina nije uočena statistički značajna razlika u razini ABO-izohemaglutinina unutar godišnjih doba.

12. Neposredan dokaz o sličnosti između biljnih supstanci i ABO- krvnih grupa dokazan je križnom reaktivnosti ABO-izohemaglutinina s različitim skupinama respiratornih alergena kod visokog udjela DDK, za oba imunoglobulinska razreda.

7. LITERATURA

1. Branch DR (2015) Anti-A and anti-B: what are they and where do they come from? *Transfusion* 55 Suppl 2: 74-9.
2. Watkins WM (2001) The ABO blood group system: historical background. *Transfusion Medicine*.11: 243-265.
3. D'Adamo PJ (1991) ABO Bias in natural immunity. *J. Naturopath.Med* 2: 11-17.
4. Springer GF, Horton RE (1969) Stimulation in man by feeding blood group-Active bacteria. *The Journal of Clinical Investigation* 48: 1280-1291.
5. Springer GF (1958) Relation of blood group active plant substances to human blood groups. *Acta Haematolog.* 20: 147-155.
6. Springer GF, Williamson P, Brandes WC (1961) Blood group activity of grama negative bacteria. *J Exp Med* 113(6): 1077-1093.
7. Abba AK, Lichtman AH, Pillai Shiv (2014) *Cellular and Molecular Immunology*, Elsevier, Canada
8. Berséus O, Boman K, Nessen SC, Westerberg LA (2013) Risks of hemolysis due to anti-A and anti-B caused by the transfusion of blood or blood components containing ABO-incompatible. *Transfusion* 53 Suppl 1: 114-123.
9. Gupte S, Bathia HM (1979) Anti-A and anti-B response after tetanus toxoid injections in normal adults and pregnant women. *Indian J Med Res* 70: 221-228.
10. Springer GF (1963) Influenza virus vaccine and blood group-A like substances. *Transfusion* 3: 223-226.
11. Silber GR, Ambrosio DM, Gorgone BC (1989) Blood-group-A-like substance present in a preparation of pneumococcal vaccine. *Ann Intern Med* 96: 580-586.
12. Daniel-Johnson J, Leitman S, Klein H, Alter H, Lee-Stroka A, Sceinberg P, Pantin J, Quillen K (2009) Probiotic-associated high titer anti-B in group A platelet donor as a cause of severe hemolytic transfusion reactions. *Transfusion* 49: 1845-1849.
13. Pérez N, Iannicelli JC, Girard-Bosch C, González S, Varea A, et al. (2010) Effect of probiotic supplementation on immunoglobulins, isoagglutinins and antibody response in children of low socio-economic status. *Eur J Nutr* 49: 173-179.
14. Praharaj I, John SM, Bandyopadhyay R, Kang G. (2015) Probiotics, antibiotics and the immune responses to vaccines *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 19:370.

15. Cooling LL, Downs TA, Butch SH (2008) Anti-A and anti-B titers in pooled group O platelets are comparable to apheresis platelets. *Transfusion* 48(10): 2106-13.
16. Godsiz J (1979) Synthesis of natural allohemagglutinins of the ABO system in healthy children aged 3 month to 3 years. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 22(4): 399-412.
17. Casali P, Notkins A (1989) CD5+ lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol Today* 10: 364-368.
18. Wuttke NJ, Macardle PJ, Zola H (1997) Blood group antibodies are made by CD5+ and by CD5- B cells. *Immunol Cell Biol* 75(5): 478-83.
19. Tangye SG (2013) To B1 or not to B1:that really is still the question! *Blood* 121: 5109-5110.
20. Hardy RR (2006) B1 B Cell development. *Journal of Immunology* 177 (5): 2749-2754.
21. Martin F, Kearney JF (2000) B-cell subset and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a „natural immune memory“. *Immunol Rev* 175: 70-9.
22. De França ND, Poli MC, Ramos PG, Borsoi CS, Colella R (2011) Titers of ABO antibodies in group O blood donors. *Rev Bras Hematol Hemoter* 33(4): 259–262.
23. Rieben R, Buchs JP, Flückiger E, Nydegger UE (1991) Antibodies to histo-blood group substances A and B: agglutination titers, Ig class, and IgG subclasses in healthy persons of different age categories. *Transfusion* 31(7): 607-15.
24. Grgičević D (2006) *Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi*; Medicinska naklada, Zagreb
25. Stussi G, Huggel K, Lutz H., Schanz U, Rieben, Seebach JD (2005) Isotype-specific detection of ABO blood group antibodies using a novel flow cytometric method. *Br J Hematol* 130(6): 954-63.
26. Dean L (2005) *The ABO Blood Group - Blood groups and red cells antigens*. Bethesda Maryland National center for Biotechnology Information (US).
27. Storry JR (2004) Review: the function of blood group-specific RBC membrane components. *Immunohematology* 20(4): 206-214.
28. Rieben R, Frauenfelder A, Nydegger UE (1996) Spectrotype analysis of human ABO antibodies:evidences for different clonal heterogeneity of IgM, IgG and IgA antibody populations. *Vox Sang* 70:104-111.
29. Klein HG, Anstee DJ (2014) *Mollison's Blood Transfusion in Clinical medicine* 12th edition. Wiley Blackwell.

30. Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM (2014) Technical manual 18th edition. AABB Bethesda Maryland USA.
31. Yamamoto F (2004) ABO blood group system-ABH oligosaccharide antigens, anti-A i anti-B, A i B glycosyltransferases, ABO genes. *Immunohematology* 20(1): 3-22.
32. Anstee DJ (2010) The relationship between blood groups and disease *Blood* 115(23): 4635-43.
33. Liumbruno GM, Franchini M (2013) Beyond immunohaematology: the role of the ABO blood group in human diseases. *Blood transfus* 11(4): 491-99.
34. O'Donnell J, Laffan MA (2001) The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. *Transfusion Medicine* 11: 343-351.
35. Storry JR, Olsson ML (2009) The ABO blood group system revisited:a review and update. *Immunohematology* 25(2): 48-59.
36. Jamamoto F (2001) Cloning and regulation of the ABO genes. *Transfusion Medicine*. 11: 281-294.
37. Daniels G (2009) The molecular genetics of blood group polymorphism. *Hum Genet* 126: 729-742.
38. Daniels G (2002) Human blood groups. Blackwell Science Oxford
39. Anstee DJ (2009) Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood* 114(2): 248-256.
40. Bloodbook.com (2008) Racial and ethnic distribution of ABO types
<http://www.bloodbook.com/world-abo.html>
41. Jukić I (2013) Učestalost genotipova ABO sustava krvnih grupa u oboljelih od tromboembolija u Hrvatskoj. Doktorski rad. Farmaceutsko – biokemijski fakultet Sveučilište u Zagrebu.
42. Cid J, Harm SK, Yazer MH (2013) Platelet transfusion-the Art and Science of Compromise. *Transfus Med Hemother* 40: 160-171.
43. Flegel WA (2015) Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis. *Transfusion* 55: 47-58.
44. Quillen K, Sheldon SL, Daniel-Johnson JA, Lee-Stroka H, Flegel WA (2011) A practical strategy to reduce the risk of passive hemolysis by screening plateletpheresis donors for high-titer ABO antibodies. *Transfusion* 51: 92-96.
45. Cooling L, Kelly K, Barton J, Hwang D, Koerner TA, Olson JD (2005) Determinants of ABH expression on human blood platelets. *Blood* 105: 3356-64.

46. Cooling L (2007) ABO and platelet transfusion therapy. *Immunohematology* 23: 20-33.
47. Chimonidou M, Dimitroulis D, Gialeraki A, Politou M, Valsami S (2015) Current trend in platelet transfusions practice: The role of ABO-RhD and human leukocyte incompatibility. *Asian Journal of transfusion Science* 9(2): 117-123.
48. Hundrić Hašpl Ž (2012) Imunohematološki aspekti (ne)učinkovitosti ABO neidentičnih krvnih pripravaka. *Liječnički vjesnik* 134 supl. 2: 15-18.
49. Fung MK, Downes KA, Shulman IA (2007) Transfusion of Platelets Containing ABO-incompatible plasma. *Arch Pathol Lab Med* 131: 909-916.
50. Zaffuto BJ, Conley GW, Connolly GC, Henrichs KF, Francis CW, Heal JM, Blumberg N, Refaai MA (2016) ABO-immune complex formation and impact on platelet function, red cell structural integrity and haemostasis: an in vitro model of ABO non-identical transfusion. *Vox Sanguinis* 110: 219-226.
51. Refaai MA, Henrichs KF, Spinelli SL, Phipps RP, Masel E, Smith BH, Francis CW, Blumberg N (2011) Platelet activation following exposure to anti-ABO antibodies - an in vitro study. *US Oncol Hematol* 7(1): 72-74.
52. Oza KK (2002) ABO mismatched platelet transfusion and acute intravascular hemolysis. *Transfusion* 47:1412-1417.
53. Pietersz RNI, Egelfreit CP, Reesink HW (2005) International forum: transfusion of apheresis platelets and groups. *Vox Sang* 88: 201-221.
54. Romphruk AV, Cheunta S, Pakote L, Kumpeera P, Sripara P, Paupairoj C, Romphruk A (2012) Preparation of single donor platelet with low antibody titers for all patients. *Transfusion and Apheresis Science*. 46: 125-128.
55. Rydberg L (2001) ABO-incompatibility in solid organ transplantation. *Transfusion Medicine* 11: 325-42.
56. Shin M, Kim SJ ABO incompatible kidney transplantation-current status and uncertainties (2011) *J of Transplantation* <http://dx.doi.org/10.1155/2011/970421>
57. Muramatsu M, Gonzalez HD, Cacciola R, Aikawa A, Ygoob MM, Puliatti C (2014) ABO incompatible renal transplants: Good or Bad? *World J Transplant* 24(1): 18-29.
58. Tobian AA, Shirey RS, Montgomery RA, Ness PM, King KE (2008) The critical role of plasmapheresis in ABO-incompatible renal transplantation. *Transfusion* 48(11): 2453-60.

59. Toki D, Ishida H, Horita S, Yamaguchi Y, and Tanabe K (2009) Blood group O recipients associated with early graft deterioration in living ABO-incompatible kidney transplantation. *Transplantation* 88: 1186-1193.
60. West LJ, Phil D, Stacey M, Pollock-Barziv MA, Dipchand AI, Lee K, Cardella CJ, Benson LN, Rebeyka IM, Coles JG (2001) ABO-Incompatible Heart Transplantation in Infants. *N Engl J Med* 344: 793-800.
61. Conway J, Manlhiot C, Allain-Rooney T, McCrindle BW, Lau W, Dipchand AI (2012) Development of donor-specific isohemagglutinins following pediatric ABO-incompatible heart transplantation. *Am J Transplant* 12(4): 888-95.
62. Worle N (2016) ABO-Mismatched Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transfus Med Hemother* 43: 3-12.
63. Patricia M. Kopko (2016) Transfusion support for ABO-Incompatible progenitor Cell Transplantation. *Transfus Med Hemother* 43:13-18.
64. Gajewski JL, Johnson VV, Sandler SG, Sayegh A, Klumpp TR (2008) A review of transfusion practice before, during and after hematopoietic progenitor cell transplantation. *Blood* 112: 3036-3047.
65. Jeyakanthan M, West LJ, (2012) Donor-specific Isohemagglutinins: Measuring the Unknown. *Am J Transplant* 12: 803-805.
66. Kumlien G, Wilpert J, Safvenberg J, Tyden G. (2007) Comparing of the tube and gel techniques for ABO antibody titration as performed in three European centers. *Transplantation* 84: S17-19.
67. AuBuchon JP, de Wildt-Eggen J, Dumont LJ (2008) Reducing the variation in performance of antibody titrations. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 132(7): 1194-1201.
68. Win N. (2011) High titre anti A/B testing donors within NHS Blood and Transplant (NHSBT) Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *Inf* 178/1.1.
69. Denomme G (2011) Titers of ABO antibodies in group O blood donors: patient safety and blood product supply remain a challenge. *Rev Bras Hematol Hemoter* 33(4): 250–251.
70. Sood R, Neelima, Kumar D, Kumar T, Kumar V, Rani S, Kumar S (2016) Antibody Titers Study in Group O Blood Donors: Tube and Column Agglutination Techniques. *J of Thrombosis and Circulation* 2:104

71. Tanabe K. (2007) Interinstitutional variation in the measurement of anti-A/B antibodies: the Japanese ABO-Incompatible Transplantation. Committee survey 27: 84(12 Suppl): S13-6.
72. Tendulkar AA, Ashok Jain P, Velaye S. (2017) Antibody titers in Group O platelet donors Asian J Transfus Sci 11(1): 22–27.
73. Kang SJ, Lim YA, Baik SY. (2014) Comparison of ABO antibody titers on the basis of the antibody detection method used. Ann Lab Med 34(4): 300-6.
74. Bazigou F, Lempesopoulos K, Kavliierou L, Cheropoulou A, Mouratidou M, Baliaga S, Koutsogianni K. Pagonis S (2015) Evaluation of Anti-A and Anti-B Allosagglutinin. Titer in Group O Plateletpheresis Donors. Hematology and Transfusion Intern Jour1(3): 17-23.
75. Karafin MS, Blagg L, Tobian AA, King KE, Ness PM, Savage WJ (2012) ABO antibody titers are not predictive of hemolytic reactions due to plasma-incompatible platelet transfusions. Transfusion 52(10): 2087-93.
76. Zar JH (2010) Biostatistical analysis. Pearson education Inc. New Jersey USA.
77. Šimundić AM (2008) Osnove biostatistike u svakodnevnoj praksi. Medicinska naklada Zagreb.

8. ŽIVOTOPIS

Ana Hećimović rođena je 06. veljače 1967. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu i srednju školu.

Školske godine 1985/86 upisuje studij medicine na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Diplomu doktora medicine stiče u veljači 1991. godine.

Pripravnički staž odrađuje u KBC „Sestre Milosrdnice“ i u DZ „Peščenica“.

Od 1992. do 1994. godine radila je u Imunološkom zavodu, u Sektoru za kliničku i eksperimentalnu imunologiju i kemiju. 1994. godine prelazi na Odjel za transfuzijsku medicinu, Imunološkog zavoda, gdje od 1998. godine vodi Odsjek za testiranje krvi, a od 2000. godine vodi i Odsjek za proizvodnju imunohematoloških reagensa.

Školske godine 1993/1994 upisuje Poslijediplomski studij prirodnih znanosti iz područja biologije, smjer biomedicina na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Titulu magistra znanosti stiče obranom teme magistarskog rada „Istraživanje specifične pasivne zaštite od *Pseudomonas aeruginosa* infekcije“.

Specijalistički ispit iz transfuzijske medicine položila je 2004. godine.

Od 2007. godine zaposlena je u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu. 2012. godine imenovana je voditeljem Odjela za proizvodnju testnih reagencija, gdje i danas radi.

Doktorski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, smjer biologija, upisuje u školskoj godini 2012/13.

Tijekom karijere sudjeluje na brojnim domaćim i međunarodnim stručnim skupovima, kongresima, radionicama i tečajevima. Autor i koautor je stručnih i znanstvenih radova, kongresnih priopćenja.

Članica je Hrvatskog društva za i transfuzijsku medicinu. Dužnost tajnice Društva obnaša od 2012. godine.

Članica je liječničke sekcije pri Hrvatskom košarkaškom savezu i Hrvatskog katoličkog liječničkog društva.