

# Povezanost genotipova ABO sustava krvnih grupa s plućnom embolijom u hrvatskoj populaciji

---

**Parašilovac, Nikolina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:587821>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-24**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Nikolina Parašilovac**

**Povezanost genotipova ABO sustava krvnih  
grupa s plućnom embolijom u hrvatskoj  
populaciji**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na predmetu Molekularna dijagnostika Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Izrađen je na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju te u Odjelu za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić i dr. sc. Jasne Bingulac-Popović, znanstvene savjetnice.

*Zahvaljujem mentoricama prof. dr. sc. Karmeli Barišić i dr. sc. Jasni Bingulac-Popović te zaposlenicama Odjela za molekularnu dijagnostiku u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu na pruženoj pomoći, prenesenom znanju te ukazanom strpljenju tijekom izrade ovog rada.*

*Puno hvala prijateljima na svim riječima ohrabrenja i što su me svojim primjerima svakim danom iznova motivirali.*

*Diplomski rad posvećujem najvećoj podršci tijekom cijelog puta obrazovanja, mojoj obitelji.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Krvne grupe .....	1
1.2. ABO sustav krvnih grupa .....	1
1.2.1. Nasljeđivanje krvnih grupa ABO sustava .....	4
1.3. Venske tromboembolije .....	5
1.3.1. Plućna embolija .....	5
1.3.1.1. Klinički znakovi i dijagnosticiranje plućne embolije .....	6
1.3.1.2. Čimbenici rizika .....	7
1.3.1.3. Liječenje plućne embolije .....	8
1.4. ABO sustav krvnih grupa i bolesti .....	9
1.4.1. ABO sustav krvnih grupa i infektivne bolesti .....	9
1.4.2. ABO sustav krvnih grupa i karcinomi .....	10
1.4.3. ABO sustav krvnih grupa i ostale bolesti .....	10
1.5. Venske tromboembolije i ABO sustav krvnih grupa .....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	14
3. MATERIJALI I METODE .....	15
3.1. Ispitanici .....	15
3.2. Uređaji i kemikalije .....	15
3.3. Metode .....	17
3.3.1. Izolacija genomske DNA .....	17
3.3.2. ABO genotipizacija .....	17
3.3.3. Statistička obrada podataka .....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	23
4.1. Rezultati .....	23
4.1.1. Usporedba skupine ispitanika i kontrolne skupine prema spolu i dobi .....	23
4.1.2. Usporedba skupine ispitanika i kontrolne skupine prema ABO fenotipu .....	23

4.1.3. Usporedba skupine ispitanika i kontrolne skupine prema ABO genotipu .....	24
4.1.4. Statistička analiza usporedbe A, B, AB i O fenotipova između skupine ispitanika i kontrolne skupine.....	25
4.1.5. Statistička analiza usporedbe ABO genotipova između skupine ispitanika i kontrolne skupine.....	27
4.2. Rasprava .....	30
5. ZAKLJUČAK .....	36
6. LITERATURA.....	37
7. SAŽETAK/SUMMARY .....	42
7.1. Sažetak.....	42
7.2. Summary.....	43
8. PRILOZI.....	44
8.1. Kratice .....	44
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

## **1. UVOD**

### **1.1. Krvne grupe**

Krv je tjelesna tekućina koja je ista u svakom čovjeku, a opet različita. Različitost molekula na membranama eritrocita glavni je kriterij po kojem se pojedinci svrstavaju u skupine određene krvne grupe. Te molekule nazivaju se eritrocitnim antigenima. Mogu biti ugljikohidratne ili proteinske građe, što je osnova za biokemijsku podjelu krvnih grupa (Labar i sur., 2007). Eritrocitni antigenski sustav najvažniji je u transfuzijskoj medicini jer nepodudarne krvne grupe darivatelja i primatelja izazivaju po život opasno stanje - reakciju hemaglutinacije za koju su odgovorna protutijela nazvana aglutinini (Yamamoto i sur., 2012). Danas je poznato 38 sustava krvnih grupa ([www.isbtweb.org](http://www.isbtweb.org)), od kojih su najpoznatiji i klinički najvažniji ABO sustav i Rh sustav (Gorakshakar i sur., 2016; Hoffbrand i sur., 2016). Rasprostranjenost krvnih grupa značajno se razlikuje između pojedinih naroda. Pretpostavlja se da je drugačija učestalost u populacijama širom svijeta rezultat selekcije tijekom epidemija koje su se događale kroz povijest (Yamamoto i sur., 2012).

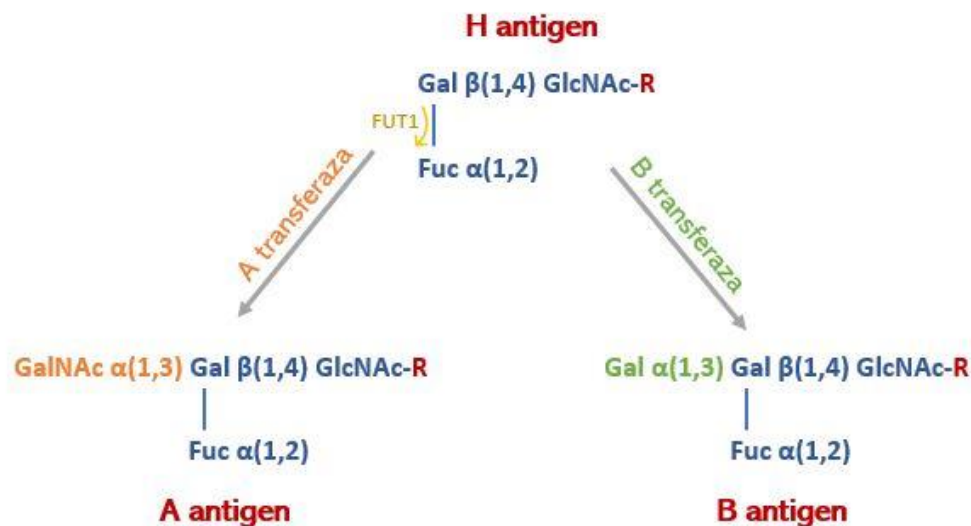
### **1.2. ABO sustav krvnih grupa**

Istražujući pojavu hemaglutinacije Karl Landsteiner je došao do revolucionarnog otkrića. Naime, 1901. u vrijeme izvođenja eksperimenta u svom laboratoriju, otkrio je da postoje najmanje tri krvne grupe; nazvao ih je krvnim grupama A, B i O. Nekoliko godina kasnije otkrivena je i AB krvna grupa od strane Lansteinerovih studenata (Tan i Graham, 2013). Osim karakterističnim ugljikohidratnim molekulama na membranama eritrocita, nazvanim aglutinogenima A i B, krvne grupe ABO sustava opisane su prisustvom specifičnih protutijela u plazmi koja su usmjerena prema aglutinogenima eritrocita različitih krvnih grupa. Ta protutijela nazvana su anti-A i anti-B aglutininima. U krvnoj plazmi mogu postojati dvije vrste protutijela eritrocitnog ABO antigenskog sustava - hladna i topla protutijela. Hladna protutijela su rezultat odgovora imunskog sustava na antigene iz okoline, kao što su površinske molekule na nekim mikroorganizmima, koje su strukturno slične eritrocitnim antigenima. Sintetiziraju se u ranoj dobi, u prvih 6 mjeseci nakon rođenja (Garraty, 2005). Ta su protutijela IgM razreda. Topla protutijela sintetiziraju se u tijelu pojedinca od trenutka kad u njega dospije nepodudarna krv, npr. za vrijeme trudnoće ili prilikom transfuzije krvi.

Većinom su IgG razreda, iako se u primarnoj reakciji imunskog sustava sintetiziraju i IgM protutijela (Labar i sur., 2007; Hoffbrand i sur., 2016).

Prema tome, u krvnoj grupi A na površini eritrocita nalaze se aglutinogeni A, a u krvnoj plazmi anti-B aglutinini, u krvnoj grupi B aglutinogeni B i anti-A aglutinini, u krvnoj grupi AB oba aglutinogena i nema prisutnih anti-A ni anti-B aglutinina, dok su u krvnoj grupi O prisutni i anti-A i anti-B aglutinini, a nema aglutinogena A niti B. Najzastupljenija krvna grupa u Hrvatskoj je A s udjelom 42 %, slijedi O s 34 %, B sa 17 % te AB sa 7 % (www.hztn.hr).

Uočeno je da postoji nekoliko podtipova krvne grupe A, od kojih su najčešći A1 i A2. Osim anti-A aglutinina, u krvnoj plazmi B nositelja prisutan je anti-A1 aglutinin, koji se slabijim intenzitetom veže samo za A1 aglutinogen, dok A2 aglutinogen prepoznaju anti-A aglutinini (Dean, 2005; Cid i sur., 2012). ABO gen zapravo kodira sintezu enzima glikoziltransferaza, a ne izravno aglutinogena. Glikoziltransferaza A i glikoziltransferaza B razlikuju se u samo četiri aminokiseline (R176G, G235S, L266M, G268A) (Dean, 2005; Yamamoto i sur., 2012). Spomenuti enzimi kataliziraju reakcije dodavanja ugljikohidrata s donorskih oblika šećera UDP-N-acetilgalaktozamina ili UDP-galaktoze na galaktozni ostatak na nereducirajućem kraju osnovnoga H antigena, koji se nalazi na membranama eritrocita kao glikoprotein ili glikolipid, stvarajući tako N-glikane. Postoje dva tipa osnovnog glikanskoga lanca, tip 1 i tip 2. Razlikuju se u vrsti veze kojom je krajnja galaktoza H antigena vezana za N-acetilglukozamin; u tipu 1 to je  $\beta(1,3)$  veza, a u tipu 2  $\beta(1,4)$  veza. U krvnoj grupi A na ugljikov atom (C-3) krajnje galaktoze u sastavu glikanskog lanca H antigena  $\alpha(1,3)$  vezom veže se N-acetilgalaktozamin (GalNAc- $\alpha(1,3)$ (Fuc- $\alpha(1,2)$ -Gal-), a u krvnoj grupi B na istu poziciju  $\alpha(1,3)$  vezom veže se D-galaktoza (Gal- $\alpha(1,3)$ (Fuc- $\alpha(1,2)$ -Gal-); osobe s krvnom grupom O ne sintetiziraju funkcionalne glikoziltransferaze pa stoga imaju samo osnovni H antigen (Fuc- $\alpha(1,2)$ -Gal-) (Cid i Yamamoto, 2012; Stryer i sur., 2013). U svijetu postoji mali postotak ljudi koji nemaju H antigen na svojim eritrocitima, tzv. O Bombay ili Oh fenotip. Do toga dolazi zato što su naslijedili oba recesivna h alela FUT1 gena. FUT1 gen kodira enzim fukoziltransferazu koja sudjeluje u sintezi H antigena. Budući da ti pojedinci nemaju H antigen, osim anti-A i anti-B aglutinina, u krvnoj plazmi imaju i anti-H aglutinine, što ih čini vrlo podložnima transfuzijskim reakcijama aglutinacije ukoliko ne prime krv istoga O Bombay fenotipa. Te osobe mogu imati A ili B alel u sastavu ABO gena, ali ne ispoljavati A, B ili AB fenotip jer nema H antigena koji je osnova za vezanje ugljikohidratnih ostataka aglutinogena A i B (Dean, 2005).



Slika 1. Struktura A, B i H antigena s tipom 2 lanca; Gal - galaktoza, GlcNAc - N-acetilglukozamin, GalNAc - N-acetilgalaktozamin, Fuc - fukoza, FUT1 - fukoziltransferaza, R - reducirajući kraj lanca (prema Anstee, 2010.)

Antigeni krvne grupe ABO sustava nisu prisutni samo na površini eritrocita, već i na staničnim membranama drugih stanica u tkivima, osobito membranama epitelnih stanica, pa se može zaključiti da nisu važni samo u transfuzijskoj medicini, već i u drugim granama medicine, poput transplantacijske medicine (Garratty, 2005; Yamamoto i sur., 2012). Oko 80 % ljudi ima dominantan Se alel FUT2 gena, što omogućuje prisustvo ovih aglutinogena na staničnim membranama tkivnih stanica te u slobodnom obliku u sekretima i drugim tjelesnim tekućinama, kao što su slina ili sjemena tekućina, dok ih u likvoru nema (Dean, 2005). FUT2 gen kodira za  $\alpha$ -1,2-fukoziltransferazu koja omogućava prijenos L-fukoze na ugljikov atom (C-2) krajnje galaktoze na tipu 1 glikanskog lanca. A i B glikoziltransferaze kataliziraju reakciju vezanja N-acetilgalaktozamina i D-galaktoze na tip 1 lanca glikana u tkivima samo ako je produkt aktivnog FUT2 gena prethodno vezao L-fukozu (Anstee, 2010). Ljudi s dominantnim Se alelom FUT2 gena jesu sekretori, dok se homozigoti za recesivan alel nazivaju nesekretori i nemaju slobodne antigene ABO sustava u tjelesnim tekućinama (Yamamoto i sur., 2012; Hoffbrand i sur., 2016). Među europskim stanovništvom najčešća mutacija koja utištava FUT2 gen je besmislena (engl. nonsense) mutacija G428A (Anstee, 2010).



### 1.2.1. Nasljeđivanje krvnih grupa ABO sustava

Molekularna osnova nasljeđivanja krvnih grupa ABO sustava otkrivena je 1990. godine kad je sekvenciran ABO gen (Anstee, 2010; Yamamoto i sur., 2012). Humani ABO gen smješten je na dugom kraku kromosoma 9 (9q34.1-q34.2) ([www.isbtweb.org](http://www.isbtweb.org)). Sadrži 7 egzona i 6 introna koji obuhvaćaju 18 kb genomske DNA. Egzoni 6 i 7 sadrže sljedove koji kodiraju oko 80 % glikoziltransferaze i 90 % katalitičke regije enzima (Gorakshakar i sur., 2016).

Krvne grupe ABO sustava nasljeđuju se autosomno dominantno, a tip krvne grupe je pod nadzorom tri glavna alela ABO gena: A, B i O (Hoffbrand i sur., 2016). Pretpostavlja se da su B i O aleli nastali od A alela tijekom evolucije (Gassner i sur., 1996; Calafell i sur., 2008; Yamamoto i sur., 2012). A i B alele razlikuje sedam točkastih mutacija, od kojih četiri rezultiraju kodiranjem različitih aminokiselina, a O alel je od A alela drugačiji po deleciji nukleotida na poziciji 261 u egzonu 6 (Dean, 2005; Gorakshakar i sur., 2016). Aleli za A i B fenotip su kodominantni, dok je alel koji određuje O fenotip recesivan. Dakle, da bi osoba bila A odnosno B fenotipa dovoljno je da od roditelja naslijedi jedan A odnosno B alel, dok osoba AB fenotipa nasljeđuje oba alela. Pojedinci s krvnom grupom O moraju naslijediti oba O alela. Utvrđeno je da alel A ima dva podtipa, A1 i A2, od kojih A2 kodira aglutinogen sa slabijim antigenskim svojstvima (Hoffbrand i sur., 2016). O alel također ima dva podtipa, O1 i O2. Razlikuju se u devet nukleotida u egzonima 6 i 7 te u četrnaest položaja u intronu 6 (Calafell i sur., 2008). Razlike u alelima rezultat su mnogobrojnih promjena u ABO genu, ponajviše pogrešnih (engl. missense) mutacija (Yamamoto i sur., 2012). Genotipizacijom osnovne 4 ABO krvne grupe na 5 osnovnih alela O1, O2, A1, A2 i B moguće je razlučiti 15 različitih genotipova (Gassner i sur., 1996).

Tablica 1. Fenotipovi i pripadajući genotipovi ABO sustava krvnih grupa (prilagođeno prema Dean, 2005.)

Fenotip	Genotip
A	A1O1, A1O2, A2O1, A2O2, A1A1, A1A2, A2A2
B	BO1, BO2, BB
AB	A1B, A2B
O	O1O1, O1O2, O2O2

### 1.3. Venske tromboembolije

Venske tromboembolije (VTE) najčešće se dijele na duboku vensku trombozu (DVT) donjih ekstremiteta i plućnu emboliju (PE). Mogu biti incidentalne ili rekurentne. Manje česti oblici VTE-a su: DVT gornjih ekstremiteta, tromboza jugularne vene, tromboza cerebralnih sinusa i intraabdominalna venska tromboza (Davidson, 2010). Učestalost VTE-a razlikuje se po spolovima. Pokazalo se da muškarci češće obolijevaju, kao i da su skloniji rekurentnim tromboembolijama (Essien i sur., 2019). Rizik za rekurentnu tromboemboliju imaju osobe s dijagnozom trombofilije, osobe koje su doživjele neizazvanu trombotičku epizodu ili imaju primarnu DVT, oni kojima je antikoagulantna terapija trajala kraće od pola godine te stariji ljudi (Prandoni i sur., 2007). Rasa također utječe na rizik od nastanka ugrušaka; stopa obolijevanja od VTE-a veća je među crncima nego bijelcima (Essien i sur., 2019).

Nasljedni čimbenici rizika koji uzrokuju trombofiliju najčešće su mutacija faktor V Leiden (FVL) i mutacija protrombin G20210A. Dakle, poremećaji u strukturi i funkciji molekula uključenih u koagulacijsku kaskadu imaju važan utjecaj na nastanak ugrušaka (Jukić i sur., 2009).

Ako se VTE ne liječi, smrtnost je oko 25 %, dok se pravovremenom prikladnom terapijom može svesti na svega 1 % do 5 %. Komplikacijama pridonose ostala patološka stanja, kao što su maligniteti, kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB), zatajenje srca, ali i starija životna dob (Essien i sur., 2019). Unatoč poboljšanjima zdravstvene skrbi, DVT i PE imaju relativno visoku stopu smrtnosti. Za osobe koje osim DVT-a razviju PE puno je veća vjerojatnost letalnog ishoda (Konecny, 2008).

#### 1.3.1. Plućna embolija

PE je opstruktivska kardiovaskularna bolest koja zahvaća krvne žile pluća. Najrašireniji uzrok opstrukcije jest ugrušak nastao uslijed DVT-a, iako začepljenje krvne žile može biti posljedica prisutnosti tumora, mjehurića zraka ili masti. PE je među najčešćim kardiovaskularnim uzrocima smrti, odmah nakon moždanog udara i infarkta miokarda (Essien i sur., 2019). Analizama *post mortem* pokazalo se da 5 % do 10 % hospitaliziranih bolesnika premine uslijed komplikacija uzrokovanih PE-om. Čak 50 % bolesnika s DVT-om razvije latentnu PE, odnosno nemaju prisutne kliničke znakove niti simptome koji bi ukazali na patološko stanje. Najopasnija posljedica PE-a je oštećenje desne klijetke srca uzrokovano plućnom hipertenzijom. Opstrukcija plućne cirkulacije povisuje tlak u krvnim žilama pluća, a visok tlak u plućnoj arteriji otežava desnoj klijetki pumpanje deoksigenirane krvi u plućnu

cirkulaciju pa se desna klijetka puni krvlju povećavajući svoj volumen i smanjujući snagu srca. Otežano izbacivanje krvi iz srca u plućnu arteriju također nastaje uslijed hipoksije koja rezultira vazokonstrikcijom krvnih žila pluća, ali i dodatno oštećuje srčani organ (Konecny, 2008; Essien i sur., 2019). PE je po život opasno patološko stanje koje može dovesti do iznenadne smrti (Prandoni i sur., 2007).

### **1.3.1.1. Klinički znakovi i dijagnosticiranje plućne embolije**

Klinički znakovi koji mogu upućivati na PE su bol u prsima, dispneja u mirovanju i tahikardija. Manji dio bolesnika žali se na hemoptizu, a kod nekih je sinkopa prvi znak. Budući da su svi navedeni znakovi nespecifični, nije uvijek jednostavno dijagnosticirati PE. Od laboratorijskih testova najvažnija pretraga jest D-dimer, koja ima vrlo visoku negativnu prediktivnu vrijednost, što znači da se mogućnost dijagnoze PE-a isključuje ako je dobiveni rezultat ispod granične vrijednosti. Određivanje vrijednosti troponina može biti korisno samo u kombinaciji s ostalim testovima. Troponin je biljeg oštećenja miokarda. Povišen je ako je došlo do ishemije srčanog mišića ili oštećenja srčanog tkiva izazvanim nečim drugim. Dakle, nije specifičan za PE, već vrijednosti mogu biti visoke i u nekim drugim patološkim stanjima. NT-proBNP jest biljeg rastezanja desne klijetke, ali nikako ne može biti samostalno primijenjen pri postavljanju dijagnoze PE-a jer povećanje volumena desne klijetke može biti druge etiologije. Stoga se NT-proBNP može koristiti također samo u kombinaciji sa slikovnim pretragama (Essien i sur., 2019).

Od slikovnih pretraga primjenjuju se: kolor dopler vena, ehokardiografija, CT plućna angiografija (CTPA) te ventilacijska ili perfuzijska scintigrafija. Kolor dopler vena donjih ekstremiteta koristi se u svrhu otkrivanja izvornog mjesta na kojem je ugrušak nastao. Ako se na vrijeme otkrije sklonost razvoju PE-a, adekvatnom profilaksom može se spriječiti formiranje ugruška. Negativan nalaz ne isključuje dijagnozu PE-a. Transtorakalna ehokardiografija je metoda koja se najčešće koristi kod bolesnika kojima je postavljena sumnja na PE kako bi se vidjelo je li došlo do oštećenja srca. CTPA je brza široko dostupna slikovna pretraga koja ukazuje na oštećenje desne klijetke, kao ehokardiografija. Razlika između tih metoda je da CTPA prva upućuje na povećanje volumena desne klijetke srca i može se upotrijebiti za procjenu prognoze, dok je ehokardiografija korisna pri praćenju terapije. Ventilacijskoj ili perfuzijskoj scintigrafiji podvrgavaju se samo oni bolesnici kod kojih se ne smije primijeniti CTPA. Metoda scintigrafije korisnija je pri otkrivanju kronične PE i njom uzrokovane kronične plućne hipertenzije (Essien i sur., 2019). Pri dijagnosticiranju

rekurentne PE koriste se pretrage ventilacije ili perfuzije pluća te spiralna CTPA (Prandoni i sur., 2007).

Više od jedne četvrtine bolesnika s dijagnozom DVT-a i/ili PE-a unutar pet godina od postavljanja dijagnoze doživi ponovnu tromboembolijsku epizodu. Osobe koje su dulje na antikoagulantnoj terapiji pod manjim su rizikom od ponovne pojave tromboembolije (Prandoni i sur., 2007.).

### **1.3.1.2. Čimbenici rizika**

Čimbenici rizika razvoja PE-a dijele se na primarne i sekundarne odnosno genetske i stečene. Od primarnih genetskih čimbenika rizika opisano je nekoliko mutacija u genima koji kodiraju proteine uključene u koagulacijsku kaskadu, čije oštećenje doprinosi nastanku nasljedne trombofilije. Kako je već navedeno, to su A1691G mutacija FVL-a i protrombin G20210A uz deficijencije proteina C, proteina S, antitrombina i heparinskog kočimbenika II (Konecny, 2008; Essien i sur., 2019).

A1691G FVL jest autosomno dominantna točkasta mutacija kod koje je arginin na poziciji 506 zamijenjen glutaminom. Najrašireniji je uzrok genetske sklonosti razvoju ugrušaka, s 5 % zastupljenosti u svjetskoj populaciji. Zbog neosjetljivosti na inaktivaciju aktiviranim proteinom C, čimbenik Va ostaje duže u cirkulaciji povećavajući koncentraciju trombina. 20 % do 50 % bolesnika s dijagnozom VTE-a ima navedenu mutaciju FVL-a (Labar i sur., 2007; Konecny, 2008; Essien i sur., 2019).

Mutacija G20210A u genu čimbenika II ili protrombina pronađena je na kromosomu 11. Utvrđeno je da dovodi do povećane transkripcije gena i sinteze protrombina. Heterozigoti imaju oko 30 % više protrombina u krvnoj plazmi. Prisutna je u 1 do 2 % asimptomatskih i 3 do 7 % osoba s trombozom (Labar i sur., 2007; Konecny, 2008; Essien i sur., 2019).

Deficijencije proteina C i proteina S česti su uzroci tromboembolija. Čak otprilike 40 % osoba s deficijencijom proteina S razvit će PE. Manjak heparinskog kočimbenika II povećava rizik od nastajanja tromba jedino u kombinaciji s drugim čimbenikom rizika. Oštećenje ili nedostatak navedenih proteina doprinosi hiperkoagulabilnosti uslijed nemogućnosti održavanja homeostaze između krvarenja i zgrušavanja. Osim toga, nasljednim čimbenicima rizika pripadaju i poremećaji u sintezi proteina koji su dio procesa fibrinolize. Deficijencija plazminogena, tkivnog aktivatora plazminogena (tPA) i čimbenika XIII, povišen inhibitor aktivatora plazminogena (PAI-1) te disfibrinogenemije mogu, iako vrlo rijetko, utjecati na rizik nastanka PE-a. Pretpostavlja se, također, da srpasta anemija povećava

sklonost tromboembolijama. Genetski čimbenici vode povećanom riziku od primarnog tromboembolijskog događaja, ali ne i sekundarnog (Konecny, 2008; Essien i sur., 2019).

Sekundarna tromboembolija je posljedica nekog drugog stanja, najčešće patološkoga. Glavni sekundarni čimbenici rizika za razvoj PE-a su operativni zahvati i velike traume, maligniteti, trudnoća te starija životna dob. PE je vodeći uzrok smrti majke nakon poroda (Anderson i Spencer, 2003). Trombofilijско stanje uzrokovano sekundarnim čimbenicima posljedica je oštećenja endotela koje privlači trombocite i molekule uključene u koagulacijsku kaskadu te rezultira formiranjem ugruška (Essien i sur., 2019). Stečenim čimbenicima rizika pripadaju hiperhomocisteinemija, antifosfolipidna protutijela (lupus antikoagulans i antikardiolipinska protutijela), čija se prisutnost očituje trombozama, učestalim pobačajima i trombocitopenijom, te višak koagulacijskih čimbenika FVIII, FIX, FXI i vWF (Labar i sur., 2007). Nadalje, u stečene čimbenike rizika ubrajaju se pretilost, hipertenzija i šećerna bolest. Osobe u ovim stanjima imaju oko dva puta veći rizik od nastanka VTE-a. Također, primjena nekih lijekova ili hormona povećava sklonost tromboemboliji. Kortikosteroidi povećavaju koncentraciju određenih molekula uključenih u kaskadu zgrušavanja krvi, poput vWF-a, PAI-1 i trombina. Nadomjesna hormonska terapija estrogenom (NHT) ili oralna kontracepcija doprinose otprilike dvostruko većem riziku nastanka VTE-a. Rizik se razlikuje ovisno o dozi, formulaciji i aktivnoj tvari (Crous-Bou i sur., 2017). Oko 85 % pacijenata s tromboembolijom ima neku kroničnu bolest koja doprinosi trombofilijском stanju. Osim toga, PE može povećati stopu mortaliteta nekih kroničnih patoloških stanja, kao što je KOPB. Pokazalo se da otprilike jedna petina akutnih komplikacija KOPB-a nastaje uslijed razvoja PE-a (Essien i sur., 2019). Prehrana, fizička aktivnost i zagađenje zraka navode se kao mogući čimbenici rizika, no rezultati studija su vrlo heterogeni te su stoga potrebna daljnja istraživanja (Crous-Bou i sur., 2017.)

### **1.3.1.3. Liječenje plućne embolije**

PE je glavni uzrok smrti hospitaliziranih pacijenata u SAD-u, od kojih najvišu stopu smrtnosti imaju kirurški bolesnici. No adekvatnom prevencijom moguće je spriječiti fatalni ishod (Park i sur., 2009). Prva terapija koja se daje bolesnicima s PE-om ili onima koji imaju visoki rizik od razvoja PE-a jest antikoagulacijska. Najčešće se primjenjuje nefrakcionirani ili niskomolekularni heparin (Essien i sur., 2019). Pritom treba paziti na kontraindikacije i komplikacije do kojih bi moglo doći, poput krvarenja ili heparinom izazvane trombocitopenije. Moguće je da je upravo nemogućnost primjene antikoagulansa kod

kirurških bolesnika u vremenu netom nakon operativnog zahvata, razlog najviše stope smrtnosti od PE-a među ovom populacijom pacijenata (Park i sur., 2009). Od dodatnih terapija primjenjuju se suplementacija kisikom kod onih bolesnika koji su u stanju hipoksije te antihipotenzivni lijekovi ako je došlo do dilatacije desne klijetke srca. U slučaju potrebe za ubrzanom razgradnjom ugruška, bolesnik može dobivati fibrinolitike. Dokazano je da rana antikoagulacijska terapija značajno smanjuje stopu smrtnosti od PE-a (Essien i sur., 2019).

## **1.4. ABO sustav krvnih grupa i bolesti**

### **1.4.1. ABO sustav krvnih grupa i infektivne bolesti**

Još se polovicom prošlog stoljeća počelo proučavati imaju li krvne grupe utjecaj na učestalost razvoja nekih patoloških stanja. Prvo se ispitala potencijalna povezanost s bolestima koagulacijskog sustava, karcinomima, peptičkim ulkusom i infekcijama raznim mikroorganizmima (Garratty, 2005). Mikrobnim organizmi vežu se za različite ugljikohidratne strukture na staničnoj površini ciljnih stanica domaćina, a kako su antigeni ABO sustava krvnih grupa ugljikohidratne građe, pretpostavilo se da bi mogli biti meta nekih mikroorganizama. Jedna od prvih uočenih povezanosti krvnih grupa ABO sustava i infektivnih bolesti bila je između bakterije *Helicobacter pylori*, koja je uzročnik peptičkog ulkusa, i ABO krvne grupe. Uočeno je da različiti sojevi ove bakterije pokazuju drugačiju sklonost vezanja za ugljikohidratne antigenske ostatke, pa se tako 5 % sojeva *H. pylori*, tzv. specijalisti, specifično veže za H antigen. Stoga su osobe s O krvnom grupom podložnije infekciji *H. pylori* i posljedično razvoju peptičkog ulkusa (Yamamoto i sur., 2012). Nadalje, osobe koje su nesekretori ABO antigena imaju oko 50 % veću vjerojatnost da će razviti peptički ulkus od sekretora, no na razvoj duodenalnog ulkusa veći utjecaj ima genotip ABO gena nego genotip FUT2 gena (Garraty, 2005). Također, sekretori su podložniji infekciji norovirusom, koji je najčešći uzročnik gastroenteritisa, te HIV-1 virusom, dok su nesekretori osjetljiviji na infekcije uzrokovane vrstama *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* i *Escherichia coli* (Anstee, 2010). Dakle, prisutnost antigena ABO sustava u tkivima i tjelesnim tekućinama utječe na osjetljivost prema zarazi nekim infektivnim agensima te na tijek razvoja infekcije.

Yamamoto i sur. utvrdili su povezanost infekcije uzročnikom malarije *Plasmodium falciparum* s ABO sustavom dokazavši da su osobe s A i B alelima podložnije težoj kliničkoj slici u odnosu na osobe s O alelima. Zaraženi eritrociti osoba s ne-O krvnim grupama

formiraju čvršće i veće “rouleaux” formacije u usporedbi s eritrocitima O krvne grupe te je izraženiji proces sekvestracije eritrocita uzrokovan infekcijom. Nastala okluzija krvnih žila doprinosi slabijoj opskrbi tkiva kisikom, hranjivim tvarima i posljedično težoj kliničkoj slici (Anstee, 2010).

#### **1.4.2. ABO sustav krvnih grupa i karcinomi**

Ekspresija ABO gena mijenja se u patološkim stanjima poput određenih maligniteta. Primijećeno je da se neki karcinomi, poput karcinoma želuca, kolona, slinovnica, jajnika, javljaju češće u osoba s A krvnom grupom nego O. To bi se moglo objasniti promatranjem karcinoma na razini stanica. Neke tumorske stanice na površini stanične membrane izražavaju iste ili slične molekule A antigena pa ih anti-A protutijela prepoznaju i označe za uništavanje od strane imunskog sustava. Za razliku od osoba s O krvnom grupom, osobe s A krvnom grupom nemaju anti-A protutijela u serumu pa se ne mogu na ovaj način boriti s tom opakom bolešću (Garratty, 2005; Yamamoto i sur., 2012; Crous-Bou i sur., 2017). Nadalje, uočeno je da je ekspresija A, B i H antigena smanjena u tumorskim stanicama, osobito leukemijama mijeloidne loze, čak do razine da ih se uopće ne može detektirati. Jedan od mehanizama koji može dovesti do smanjenja ekspresije antigena jest metilacija promotorske regije ABO gena, čime se ograničava transkripcija gena i sinteza glikoziltransferaza. No čini se da kod leukemija to nije uzrok, već dolazi do poremećaja u strukturi glikoziltransferaza, što onemogućava vezanje antigena krvnih grupa ABO sustava na staničnu membranu eritrocita (Garraty, 2005). Smanjenje ekspresije antigena ABO sustava na staničnoj površini tumorskih stanica razmjerno je potencijalu metastaziranja svih tumora (Ewald i Sumner, 2016).

Wolpin i sur. zaključili su da je rizik za razvoj karcinoma gušterače veći kod nositelja ABO genotipa ne-O krvne grupe. Istražujući malo detaljnije, ABO genotipizacijom dobili su da genotipovi AO, BO, AA i BB rastućim redoslijedom imaju veću vjerojatnost obolijevanja u odnosu na genotip OO. B alel najviše pridonosi riziku od karcinoma gušterače, pa slijede A1, A2 i na kraju O bez značajne razlike između O1 i O2 alela (Wolpin i sur., 2009; Yamamoto i sur., 2012).

#### **1.4.3. ABO sustav krvnih grupa i ostale bolesti**

Jukić i sur. 2012. ispitali su utječu li genotipovi ABO krvne grupe na rizik razvoja infarkta miokarda kao arterijske tromboembolije u hrvatskoj populaciji. Nisu dobili statistički

značajnu razliku u učestalosti infarkta miokarda kod ne-OO i OO genotipova između skupine ispitanika i kontrolne skupine. Jedino je genotip O1A1 imao granično veću vjerojatnost razvoja infarkta (OR 1,66; 95 % CI 1,03-2,68). Rezultati drugih studija vrlo su raznoliki te su stoga potrebna daljnja istraživanja (Jukić i sur., 2012). Međutim, krvne grupe ABO sustava mogu utjecati na razvoj demencije i kognitivnih oštećenja. Iza toga također stoji različita sklonost nastanku ugrušaka zbog drugačijih koncentracija FVIII i vWF u krvnoj plazmi osoba nositelja A, B, AB i O krvnih grupa. Vuk Pisk i sur. 2019. ispitali su povezanost ABO krvnih grupa i psihijatrijskih poremećaja u hrvatskoj populaciji te utvrdili da je vjerojatnost razvoja psihijatrijskog poremećaja skoro tri puta veća u nositelja AB krvne grupe u usporedbi s ostalima. Općenito, osobe s ne-O krvnom grupom sklonije su kognitivnim poremećajima nastalim uslijed cirkulacijskih promjena (Crous-Bou i sur., 2017; Vuk Pisk i sur., 2019). Ispitivani su utjecaji ABO krvnih grupa na nastanak esencijalne hipertenzije, šećerne bolesti i hiperlipidemije no, rezultati studija su nekonzistentni i zahtijevaju daljnja istraživanja (Ewald i Sumner, 2016).

### **1.5. Venske tromboembolije i ABO sustav krvnih grupa**

U ranijim studijama proučavana je povezanost ABO krvne grupe s pojavom VTE-a u kliničkim oblicima DVT-a i PE-a. Najveći broj studija govori da manju sklonost pojavi venskih tromboembolija imaju osobe nositelji krvne grupe O u odnosu na ne-O krvne grupe. To se primarno događa uglavnom zbog otprilike 25 % niže plazmatske koncentracije FVIII i vWF-a u krvnoj plazmi osoba O krvne grupe u odnosu na ostale (Yamamoto i sur., 2012; Crous-Bou i sur., 2017). Također, osobe A2 fenotipa imaju manju stopu obolijevanja od VTE-a u usporedbi s drugim ne-O krvnim grupama, što se isto može potkrijepiti nižim količinama FVIII i vWF-a u njihovoj krvnoj plazmi (Anstee, 2010). FVIII je jedan od proteina sustava čimbenika zgrušavanja krvi. Do aktivacije trombinom, u cirkulaciji je vezan za vWF koji ga štiti od proteolize. Nakon aktivacije odvaja se od vWF-a te uz FIXa sudjeluje u aktivaciji FX, što u konačnici vodi većim količinama trombina u krvnoj plazmi odnosno većem kapacitetu nastajanja ugrušaka (Labar i sur., 2007; Konecny, 2008). Na površini oba glikoproteina, i FVIII-a i vWF-a, kao N-vezani glikani nalaze se antigeni ABO sustava koji onemogućuju da ih enzimi proteaze razgrade. vWF, koji sadrži N-vezane ABO antigene, ima otprilike dvostruko duže poluvrijeme života od onog koji na sebi nema ABO antigene, što objašnjava veće koncentracije ovog čimbenika u krvnoj plazmi osoba s A, B i AB krvnim grupama nego kod osoba O krvne grupe (Anstee, 2010; Crous-Bou i sur., 2017). Izmjerene



veće količine ovih čimbenika u krvnoj plazmi ne-O osoba poduprijele su hipotezu da su pojedinci s krvnim grupama A, B i AB skloniji stvaranju krvnih ugrušaka od pojedinaca s krvnom grupom O (Garraty, 2005).

S druge strane, Ohira i sur. došli su do otkrića da razlike u koncentraciji FVIII u krvnoj plazmi uzrokovane različitim krvnim grupama ABO sustava ipak nisu glavni i jedini mehanizam kojim ABO krvne grupe doprinose nastanku VTE-a. Naime, Afroamerikanci imaju veću incidenciju VTE-a od bijelaca, a u njihovoj populaciji prevladava krvna grupa O. Međutim, koncentracija FVIII, ali i udio drugih okolišnih čimbenika rizika, viši su nego u bijelaca. Također, dobiven je veći omjer izgleda (OR) za obolijevanje od VTE-a pri usporedbi A i O krvnih grupa nego B i O krvnih grupa, a koncentracija FVIII viša je u osoba s B krvnom grupom nego s A krvnom grupom (Ohira i sur., 2007). Dakle, povišena plazmatska koncentracija FVIII u osoba ne-O krvnih grupa vjerojatno nije jedini čimbenik rizika za razvoj VTE-a, već tom doprinose i drugi mehanizmi koji su posredovani molekulama čija je količina određena pripadnošću ne-O krvnim grupama. Jedan od dodatnih mehanizama mogle bi biti razlike u glikozilaciji E- i P-selektina, međustanične adhezijske molekule-1 (ICAM-1) i čimbenika nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ), koje su pod utjecajem ABO gena. Nabrojene glikoproteinske molekule važne su u upalnim odgovorima i pri održavanju integriteta membrana epitelnih stanica krvnih žila te stoga mogu utjecati na proces formiranja ugruška (Wolpin i sur., 2010; Yamamoto i sur., 2012).

Wu i sur. su metaanalizom pokazali da je otprilike dvostruko veći rizik da će ne-O krvna grupa oboljeti od VTE-a nego O krvna grupa (Wu i sur., 2008). U skladu s tim su rezultati Wolpina i sur. koji su dobili da je oko dva puta veća vjerojatnost da osobe s ne-O krvnom grupom razviju idiopatsku PE u usporedbi s nositeljima O krvne grupe. Idiopatska PE dijagnosticirana je onim bolesnicima koji nisu imali dijagnozu aktivnog maligniteta te nisu doživjeli veliku traumu ili bili na operativnom zahvatu unutar jednog mjeseca od utvrđivanja PE-a. Također, primijetili su da bivši i trenutno aktivni pušači s A, B i AB krvnim grupama imaju veći rizik za razvoj PE-a od nepušača istih krvnih grupa, što ukazuje na interakciju genetskih i okolišnih čimbenika rizika pri nastanku tromba (Wolpin i sur., 2010.).

Nadalje, Spiezia i sur. izvijestili su o rezultatima studije utjecaja ABO krvne grupe i nasljedne trombofilije na razvoj DVT-a. Nasljedna trombofilija, kojom su obuhvaćene deficijencije antitrombina, proteina C i proteina S te mutacije FVL i protrombin G20210A, u kombinaciji s krvnom grupom ABO sustava povećava rizik obolijevanja od DVT-a. Osobe s ne-O krvnom grupom i nasljednom trombofilijom imaju sedam puta veću vjerojatnost pojave DVT-a u životu od osoba koje su O krvne grupe i nemaju nasljednu trombofiliju. Međutim,

autori smatraju da razlike u koncentraciji FVIII i vWF-a uzrokovane različitim ABO krvnim grupama malo utječu na sklonost razvoju tromboembolije i da postoji neki drugi još neistraženi mehanizam kojim pripadnost određenoj krvnoj grupi utječe na podložnost razvoju VTE-a (Spiezia i sur., 2012).

Franchini i Makris prikazali su objedinjene rezultate nekoliko studija koji se slažu u jednom - ne-O krvne grupe imaju otprilike dvostruko veći rizik od pojavnosti VTE-a od O krvne grupe. Ima li osoba nositelj ne-O krvne grupe uz to FVL mutaciju, vjerojatnost od pojave VTE-a je oko četiri puta veća u usporedbi s nositeljem O krvne grupe bez mutacije (Franchini i Makris, 2012). Također, nije isti rizik od pojave VTE-a kod osoba koje su već imale trombotički događaj i u onih koje nisu. Ne-O krvna grupa uz stariju dob nosi otprilike duplo veći rizik od pojave rekurentne tromboembolije nego od pojave incidentalne tromboembolije (Ohira i sur., 2007).

Jedna hipoteza govori da je veća sklonost zgrušavanju krvi kod osoba s ne-O krvnim grupama u odnosu na one s O krvnom grupom bila prednost za preživljavanje u davnim vremenima. Osim antigena eritrocitne krvne grupe, oporavku od ozljeda s krvarenjem pridonosile su mutacije FVL i protrombin G20210A (Anstee, 2010). Neki znanstvenici preporučuju da bi bilo korisno uvesti test određivanja ABO krvne grupe u standardne testove probira nasljedne trombofilije kako bi se povećan rizik od nastanka ugrušaka što prije uočio i na vrijeme se započelo s preventivnim tretmanom (Franchini i Makris, 2012).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

ABO sustav krvnih grupa je najvažniji sustav krvnih grupa u transfuzijskoj i transplantacijskoj medicini. Dosadašnjim istraživanjima dokazana je veća ili manja povezanost između ABO krvne grupe i kardiovaskularnih, tumorskih te infektivnih bolesti. PE se ubraja u venske tromboembolije. Najčešće je posljedica pojave ugruška u krvnim žilama plućne cirkulacije. Budući da ABO krvne grupe potencijalno uzrokuju različitu sklonost nastanku ugrušaka, u više studija ispitivana je povezanost ABO krvne grupe i PE-a. Većina rezultata slaže se da nositelji ne-O krvne grupe (A, B i AB) imaju veću sklonost tijekom života oboljeti od PE-a u odnosu na nositelje O krvne grupe. Iako velik dio studija govori da O alel ne doprinosi trombotičkom riziku te da nositelji A krvne grupe imaju najveći rizik, rezultati su ipak nekonzistentni i razlikuju se među populacijama.

Cilj ovog rada bio je utvrditi postoji li povezanost između genotipova ABO sustava krvnih grupa, kao čimbenika rizika, i pojave PE-a u hrvatskoj populaciji retrospektivnom studijom između skupine bolesnika s dijagnozom PE-a i kontrolne skupine.

Specifični ciljevi:

- odrediti genotipove ABO krvnih grupa kod bolesnika s PE-om
- ispitati povezanost između genotipova ABO i PE-a usporedbom ABO genotipova uzoraka skupine ispitanika i kontrolne skupine
- usporediti dobivene rezultate sa sličnim studijama provedenim u svijetu

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Ispitanici**

U ovom radu korišteni su uzorci 109 ispitanika, od kojih je 56 muškaraca i 53 žene. Ispitanicima je u Klinici za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Dubrava i Kliničke bolnice Merkur dijagnosticirana PE. Srednja dob ispitanika je 71 (23-95) godina. Vrsta uzorka bila je puna krv uzeta na EDTA antikoagulans.

Kontrolna skupina sastojala se od 303 dobrovoljna darivatelja krvi pri Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu (HZTM) bez tromboze u povijesti bolesti, sa srednjom dobi 39 (16-76) godina, od kojih je 180 muškaraca i 123 žene. Vrsta uzorka bila je ista kao u skupini ispitanika.

#### **3.2. Uređaji i kemikalije**

Iz uzoraka ispitanika izolirana je genomska DNA u Odjelu za molekularnu dijagnostiku (OMD) HZTM-a na uređaju za automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina. Za izolaciju su korišteni:

- 1) QIAcube uređaj (QIAGEN, Njemačka)
- 2) QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Njemačka)
- 3) Eppendorf epruvete od 1,5 mL i 2 mL
- 4) plastični adapteri za centrifugiranje kolona sa silika-gel membranom u epruvetama za eluciju
- 5) gumeni čepovi koji označavaju poziciju i broj uzorka na inkubatoru s miješalicom
- 6) nastavci s filterima od 200  $\mu$ L i 1000  $\mu$ L
- 7) pipeta do 1000  $\mu$ L

Nakon izolacije genomske DNA uslijedila je ABO genotipizacija za koju su korišteni materijali i uređaji za provođenje lančane reakcije polimeraze pomoću početnica specifičnih za sljedove (PCR-SSP) prema metodi Gassnera i sur. (1996.), te materijali i uređaji za elektroforezu i slikanje gela:

- 1) sterilni kabinet s laminarnim protokom zraka (Iskra Pio LFVP9, Slovenija)
- 2) PCR uređaj ABI 2720 (Applied Biosystems, SAD)
- 3) Elchrom Scientific sustav za elektroforezu
- 4) UV transiluminator (TFX-20.MC, EEC)
- 5) UVISAVE-Q9 HOD UVITEC kamera (Uvitec Ltd, UK)

- 6) vorteks uređaj
- 7) računalo
- 8) Eppendorf epruvete od 1,5 mL i 2 mL
- 9) epruvete za PCR u stripu od 8 jažica
- 10) stalci
- 11) pipete od 10  $\mu$ L, 100  $\mu$ L i 1000  $\mu$ L
- 12) nastavci za pipete

Otopine i kemikalije korištene za provođenje PCR-SSP reakcije i elektroforeze:

- 1) početnice za alel specifični PCR od 8 reakcija i za internu kontrolu (ulomak HGH-humanog hormona rasta):
  - 01-a 5'-TTA AGT GGA AGG ATG TCC TCG TCG TA -3'
  - 01-b 5'-TAA GTG GAA GGA TGT CCT CGT CGT G -3'
  - 01-r 5'-ATA TAT ATG GCA AAC ACA GTT AAC CCA ATG -3'
  - 02-a 5'-TCG ACC CCC CGA AGA AGC T -3'
  - 02-b 5'-CGA CCC CCC GAA GAA GCC -3'
  - 02-r 5'-AGT GGA CGT GGA CAT GGA GTT CC -3'
  - B-a 5'-ATC GAC CCC CCG AAG AGC G -3'
  - B-b 5'-CCG ACC CCC CGA AGA GCC -3'
  - B-r 5'-AGT GGA CGT GGA CAT GGA GTT CC -3'
  - A2-7 5'-CAG GCG GTC CGG AAG CG -3'
  - A2-8 5'-CAG GCG GTC CGG AAC ACG -3'
  - A2-r/2 5'-GTG TGT GTG ATT TGA GGT GGG GAC -3'
  - HGH a 5'-TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A -3'
  - HGH b 5'-CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC -3'
- 2) 10x pufer za amplifikaciju uz 1,5 M MgCl<sub>2</sub>
- 3) 10 mM dNTP mješavina (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 4) Taq DNA polimeraza (5 U/ $\mu$ L)
- 5) bidestilirana voda
- 6) agarozni gel za elektroforezu (PCR Check IT Wide Mini 4x25 s etidij-bromidom, AL-Laborthechnik, Austrija)
- 7) pufer za nanošenje uzoraka
- 8) TBE pufer
- 9) etidij-bromid

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Izolacija genomske DNA

Genomska DNA izolirana je iz uzoraka ispitanika u OMD-u automatiziranom metodom izolacije pomoću QIAcube uređaja. Izolacija je provedena standardnim QIAGEN testnim kitom (QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Njemačka) za izolaciju genomske DNA na kolonama prema radnoj uputi Odjela RU-OMD-033-QIAcube izolacija nukleinskih kiselina. Komplet reagensija QIAamp DNA Blood Mini Kit sadrži: lizirajući pufer AL, apsolutni etanol, pufer za ispiranje AW 1, pufer za ispiranje AW 2, pufer za eluciju AE, QIAGEN proteazu i kolone sa silika-gel membranom.

QIAcube je automatizirani uređaj za izolaciju nukleinskih kiselina. Sastavljen je od inkubatora s miješalicom, sustava za pipetiranje s robotskom rukom, nosača za filter nastavke, nosača za bočice reagensa, centrifuge i spremnika za otpad. Na uređaju je moguće izolirati DNA molekulu iz dva do dvanaest uzoraka u isto vrijeme. Jedna serija uzoraka prati isti protokol koji je određen vrstom uzorka, početnim i elucijskim volumenima.

Početni volumen uzorka za izolaciju DNA iz pune krvi jest 200  $\mu\text{L}$  i jednak je elucijskom volumenu. Radna otopina proteaze pripremi se otapanjem liofiliziranog enzima prema uputama proizvođača i pohrani kao alikvoti na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do upotrebe. U oba pufera za ispiranje treba se dodati apsolutni etanol prije nego što se upotrijebe. Nakon što se QIAcube uređaj uključi i otvori, postavi se nosač s reagensima (pufer AL, pufer AW1, pufer AW2, apsolutni etanol i pufer AE). Zatim se napune nosači s nastavcima s filterima od 1000  $\mu\text{L}$  i 200  $\mu\text{L}$  te postavi proteaza u epruveti od 1,5 mL. Slijedi umetanje adaptera u centrifugu. Na adapterima se nalaze kolona sa silika-gel membranom i epruveta za eluciju. Posljednji korak je umetanje uzoraka u epruvetama od 2 mL i gumenih čepova u inkubator s miješalicom. Nakon toga na zaslonu se odabere odgovarajući program za izolaciju i pokrene uređaj. Po završetku izolacije izvade se i zatvore elucijske epruvete te se uređaj očisti. Izolirana DNA pohrani se u hladnjaku na  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  do postupka ABO genotipizacije.

#### 3.3.2. ABO genotipizacija

ABO genotipizacija provedena je pomoću “*in house*” PCR-SSP metode prema RU-OMD-009-ABO genotipizacija, a početnice su preuzete iz rada Gassnera i sur. (1996.). Postupci pripreme izvodili su se u sterilnom kabinetu. Na samom početku bilo je potrebno prirediti osam mješavina početnica, koje su podijeljene u alikvote i zamrznute na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Prilikom svake serije ABO genotipizacije alikvot svake mješavine početnica otapan je do sobne temperature prije korištenja. Svaka pojedina mješavina početnica sadržavala je dvije specifične početnice za ciljnu sekvencu i par početnica za internu kontrolu. Pripremljena je na način da se u Eppendorf epruvetu od 1,5 mL otpipetiralo 100  $\mu$ L specifične početnice 5' (20  $\mu$ M), 100  $\mu$ L specifične početnice 3' (20  $\mu$ M), po 10  $\mu$ L HGH-a (20  $\mu$ M) i 10  $\mu$ L HGH-b (20  $\mu$ M) te 780  $\mu$ L bidestilirane vode. Kombinacije specifičnih početnica u osam različitih mješavina početnica prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Kombinacije specifičnih početnica u osam mješavina početnica za PCR-SSP ABO genotipizaciju

Mješavina početnica	1	2	3	4	5	6	7	8
Specifične početnice	01-a	01-b	02-a	02-b	B-a	B-b	A2-7	A2-8
	01-r	01-r	02-r	02-r	B-r	B-r	A2-r/2	A2-r/2

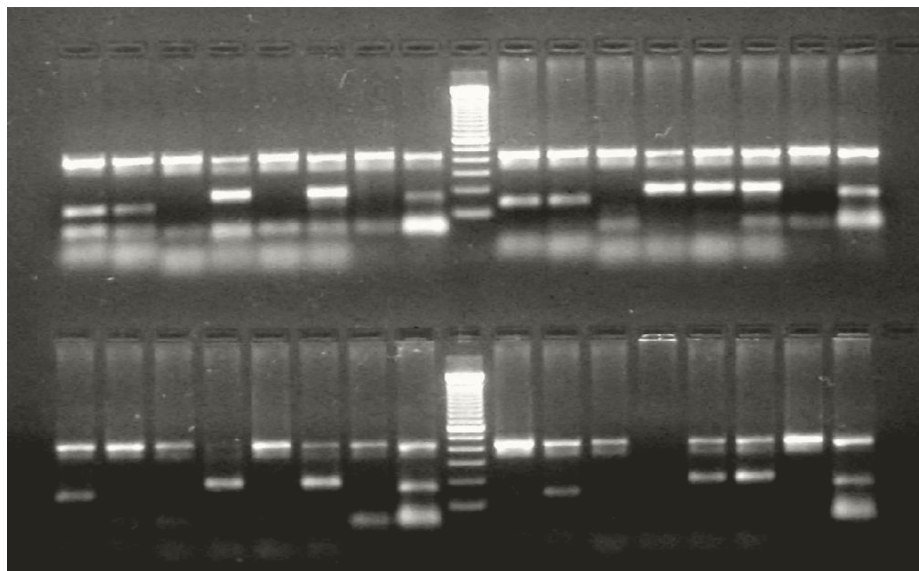
Proces ABO genotipizacije započinjao je svakodnevnom pripremom PCR-SSP mješavine. Za jedan uzorak bilo je potrebno pomiješati 20  $\mu$ L 10x PCR pufera s 15 mM  $MgCl_2$ , 8  $\mu$ L 10 mM dNTP-a, 2  $\mu$ L Taq DNA polimeraze, 60  $\mu$ L bidestilirane vode i 10  $\mu$ L uzorka izolirane genomske DNA, što ukupno čini 100  $\mu$ L PCR-SSP mješavine. Budući da je serija po jednom radnom danu uključivala genotipizaciju DNA iz 12 uzoraka, pripremana je mješavina s 13 puta većim volumenima izuzevši uzorak, nakon čega je podijeljena u 12 alikvota po 90  $\mu$ L te je u svaki alikvot dodano po 10  $\mu$ L odgovarajućeg uzorka. Tako pripremljene PCR-SSP mješavine bilo je potrebno promiješati na vorteks uređaju. Nakon toga u svaku jažicu PCR stripa dodano je 10  $\mu$ L mješavine početnica na način da je prva jažica svakog stripa sadržavala mješavinu početnica 1, druga jažica mješavinu početnica 2 itd. Zatim je dodano po 10  $\mu$ L PCR-SSP mješavine u jažice, tako da je pojedini PCR strip sadržavao jedan uzorak, nakon čega su bile zatvorene i postavljene na PCR uređaj. Denaturacija genomske DNA bila je provedena na 95 °C, nakon čega je uslijedilo 35 ciklusa PCR-SSP reakcije. Po završetku umnažanja temperatura u PCR uređaju spustila bi se na 4 °C, čime se omogućilo očuvanje umnoženih PCR produkata do daljnjeg postupka analize. Program rada PCR uređaja koji je korišten opisan je u Tablici 3.

Tablica 3. Program rada PCR uređaja korišten za ABO genotipizaciju

Temperatura (°C)	Trajanje (s)	Broj ciklusa
95	120	/
95 64 72	30 60 45	10 ciklusa
95 61 72	30 60 45	25 ciklusa
4	do isključenja	/

Sljedeći korak, nakon završetka PCR-SSP reakcije, bila je provjera umnoženih PCR produkata na agaroznom gelu metodom elektroforeze prema RU-OMD-011-Elektroforeza. Za provjeru se pripremi uzorak za nanošenje na gel od 8  $\mu$ L PCR produkta i 2  $\mu$ L pufera za nanošenje uzorka, koji se sastoji od glicerola i boje bromfenol plavilo. Glicerol olakšava ukapavanje, a boja omogućava praćenje putovanja na gelu. Prije nanošenja uzorka na sustav za elektroforezu obavezno se treba isključiti pumpa za recirkulaciju pufera. Uzorci se nanose u jažice na komercijalnom agaroznom PCR Check IT Wide Mini 4x25 gelu s etidij-bromidom. U posljednju jažicu u svakom retku nanese se molekularni biljeg od 100 pb kako bi se moglo odrediti veličine PCR produkata. Nakon nanošenja zatvori se kada, namjestite uvjeti i pokrene sustav. Elektroforeza traje 15 minuta na 151 V i 998 mA. Kad elektroforeza završi, gel se obasja UV svjetlom pod UV transiluminatorom i fotografira kamerom prema RU-OMD-012-Snimanje gela. Vidljivi umnoženi fragmenti gena hormona rasta znače da je amplifikacija molekula DNA bila uspješna. Na temelju veličine specifičnih PCR produkata odredi se ABO genotip za svaki uzorak.





Slika 2. Elferogram umnoženih PCR produkata ABO gena; genotipovi u prvom redu: O1A1 (12468), molekularni biljeg i O1B (124568); genotipovi u drugom redu: O1O1 (1468), molekularni biljeg i A1B (24568)

Tablica 4. Tablica za očitavanje ABO genotipa iz elferograma. Prikazano 15 mogućih genotipova dobivenih kombinacijama A1, A2, B, O1 i O2 alela

Reakcija br.	1	2	3	4	5	6	7	8		
PCR produkt (pb)	134	133	194	193	195	194	172	173		
Specifičnost	O1 (+)	O1 (-)	O2 (+)	O2 (-)	B (+)	B (-)	A2 (+)	A2 (-)		
Rezultati									Genotip	Fenotip
Pozicija 1 pozitivna (O1)	+	-	-	+	-	+	-	+	O1O1	O
	+	+	+	+	-	+	-	+	O1O2	O
	+	+	-	+	+	+	-	+	O1B	B
	+	+	-	+	-	+	-	+	O1A1	A
	+	+	-	+	-	+	+	+	O1A2	A

Reakcija br.	1	2	3	4	5	6	7	8		
PCR produkt (pb)	134	133	194	193	195	194	172	173		
Specifičnost	O1 (+)	O1 (-)	O2 (+)	O2 (-)	B (+)	B (-)	A2 (+)	A2 (-)		
Rezultati									Genotip	Fenotip
Pozicija 3 pozitivna (O2)	-	+	+	-	-	+	-	+	O2O2	O
	-	+	+	+	+	+	-	+	O2B	B
	-	+	+	+	-	+	-	+	O2A1	A
	-	+	+	+	-	+	+	+	O2A2	A
Pozicija 5 pozitivna (B)	-	+	-	+	+	-	-	+	BB	B
	-	+	-	+	+	+	-	+	A1B	AB
	-	+	-	+	+	+	+	+	A2B	AB
Pozicija 2/4/6 pozitivna (ne O1/O2/B)	-	+	-	+	-	+	-	+	A1A1	A
	-	+	-	+	-	+	+	+	A1A2	A
	-	+	-	+	-	+	+	-	A2A2	A

### 3.3.3. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu podataka korišten je računalni program MedCalc (MedCalc Software Version 19.3.1., Mariakerke, Belgium). Od deskriptivnih podataka prikazani su spol, dob, ABO fenotip i ABO genotip. Spol, ABO fenotip i ABO genotip izraženi su kao apsolutne i relativne frekvencije, dok su za dob određeni medijan i raspon.

Razlike u kategorijskim varijablama između ispitivane i kontrolne skupine, odnosno ABO fenotipovima i genotipovima, analizirane su hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testom i Fisherovim egzaktnim testom. Prednost korištenja imao je  $\chi^2$  test osim u slučajevima kad postavljeni uvjeti za korištenje ovog testa nisu bili zadovoljeni. Naime, ako je više od 20 % polja tablice imalo vrijednost  $\geq 5$ , za izračun vrijednosti p primijenjen je Fisherov egzaktni test.

Pri izračunu vjerojatnosti rizika korišten je omjer izgleda (OR) uz 95 %-tni interval pouzdanosti (CI). Da bi vrijednost OR bila statistički značajna, 95 %-tni CI ne smije obuhvaćati jedinicu, odnosno obje granične vrijednosti intervala moraju biti niže ili više od 1. Također, OR ima značenje samo ako je na temelju prethodno izračunate vrijednosti p dobiveno da je prisutna statistički značajna razlika između ispitivanih svojstava (Šimundić, 2008).

U provedenim analizama razina statističke značajnosti postavljena je na 0,05, tj. 5 %. Dakle, vrijednost p jednaka ili viša od 0,05 znači da nema statistički značajne razlike između ispitivanih svojstava, a vrijednost p niža od 0,05 ukazuje na statistički značajnu razliku.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati

#### 4.1.1. Usporedba skupine ispitanika i kontrolne skupine prema spolu i dobi

ABO genotipizacijom određeni su genotip i fenotip skupini ispitanika od 109 bolesnika s PE-om i kontrolnoj skupini od 303 dobrovoljna darivatelja krvi te su dobiveni rezultati uspoređeni. Razvrstavanjem podataka prema spolu utvrđeno je u skupini bolesnika 51 % muškaraca i 49 % žena, a u kontrolnoj skupini 59 % muškaraca i 41 % žena. Analizom starosne dobi dobiveno je da je medijan dobi skupine ispitanika 71 godina uz raspon 23-95 godina; u kontrolnoj skupini medijan je 39 godina uz raspon 16-76 godina, iz čega je vidljivo da kontrolnu skupinu sačinjava ponešto mlađa populacija od one u skupini ispitanika. Raspodjela podataka o obje ispitivane skupine prema spolu i dobi prikazana je u Tablici 5.

Tablica 5. Podaci o spolu i dobi kod skupine bolesnika i kontrolne skupine

Spol	Skupina ispitanika		Kontrolna skupina	
	N1	Dob/godina	N2	Dob/godina
Muški	56	65 (23-91)	180	42 (16-64)
Ženski	53	77 (31-95)	123	36 (18-76)
Ukupno	109	71 (23-95)	303	39 (16-76)

N1 i N2 - broj sudionika studije

#### 4.1.2. Usporedba skupine ispitanika i kontrolne skupine prema ABO fenotipu

Najzastupljenija krvna grupa u skupini ispitanika prema fenotipu je A s udjelom 39 %. Slijede krvne grupe O, B i AB s udjelima 27 %, 21 % i 13 %. U kontrolnoj skupini pak prevladava O krvna grupa s udjelom 40 %, nakon koje slijede A s 38 %, B sa 17 % te AB s 5 %. Raspodjela apsolutnih i relativnih frekvencija fenotipova ABO krvnih grupa obje ispitivane skupine prikazana je u Tablici 6.

Tablica 6. ABO fenotipovi kod skupine bolesnika i kontrolne skupine

ABO fenotip	Skupina ispitanika		Kontrolna skupina		Ukupno (N1+N2)
	N1	Postotak/%	N2	Postotak/%	
A	43	39	115	38	158
B	23	21	50	17	73
AB	14	13	16	5	30
O	29	27	122	40	151
Ukupno	109	100	303	100	412

N1 i N2 - broj sudionika studije

#### 4.1.3. Usporedba skupine ispitanika i kontrolne skupine prema ABO genotipu

U skupini ispitanika najzastupljeniji ABO genotip je A1O1 s 24,8 %, dok je u kontrolnoj skupini to genotip O1O1 s udjelom od 37,3 %. Genotip O2O2 nije pronađen u skupini ispitanika, a u kontrolnoj skupini zabilježen je samo jedan slučaj. Genotipovi O2A1 i A2B najmanje su zastupljeni u skupini ispitanika s udjelom od 0,9 %. Izuzev genotipa O2O2 s udjelom 0,3 %, u kontrolnoj skupini najmanji udio imaju genotipovi BB i A2B s vrijednostima udjela 0,7 % i 0,9 %. O2A2, A2A2 i O2B genotipovi nisu zabilježeni ni u jednoj skupini. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 7.

Tablica 7. ABO genotipovi kod skupine bolesnika i kontrolne skupine

ABO fenotip	ABO genotip	Skupina ispitanika		Kontrolna skupina		Ukupno (N1+N2)
		N1	Postotak/%	N2	Postotak/%	
O	O1O1	25	22,9	113	37,3	138
	O1O2	4	3,6	8	2,6	12
	O2O2	-	-	1	0,3	1

ABO fenotip	ABO genotip	Skupina ispitanika		Kontrolna skupina		Ukupno (N1+N2)
		N1	Postotak/%	N2	Postotak/%	
A	O1A1	27	24,8	82	27,1	109
	O1A2	3	2,8	11	3,6	14
	O2A1	1	0,9	5	1,7	6
	O2A2	-	-	-	-	-
	A1A1	9	8,3	12	4,0	21
	A1A2	3	2,8	5	1,7	8
	A2A2	-	-	-	-	-
B	O1B	18	16,5	48	15,8	66
	O2B	-	-	-	-	-
	BB	5	4,6	2	0,7	7
AB	A1B	13	11,9	13	4,3	26
	A2B	1	0,9	3	0,9	4
Ukupno		109	100,0	303	100,0	412

N1 i N2 - broj sudionika studije

#### 4.1.4. Statistička analiza usporedbe A, B, AB i O fenotipova između skupine ispitanika i kontrolne skupine

$\chi^2$  testom dokazano je da postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti ne-O fenotipova i O fenotipa između skupine ispitanika i kontrolne skupine ( $p=0,011$ ). Postavljena razina statističke značajnosti bila je  $p=0,050$ . Izračunom omjera izgleda (OR) dobiveno je da osobe nositelji ne-O krvne grupe imaju veću vjerojatnost obolijevanja od PE-a (OR 1,86; 95 % CI 1,15-3,01) od pojedinaca s O krvnom grupom. Rezultati statističke usporedbe prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Statistička analiza usporedbe ne-O i O ABO fenotipova

ABO fenotip	Skupina ispitanika	Kontrolna skupina	p	OR	95 % CI
ne-O	80	181	0,011	1,86	1,15 - 3,01
O	29	122		-	

p - vrijednost određena  $\chi^2$  testom, OR - omjer izgleda, 95 % CI – 95 %-tni interval pouzdanosti

Podaci pojedinačne usporedbe  $\chi^2$  testom nositelja A, B i AB krvnih grupa s O krvnom grupom između dviju skupina prikazani su u Tablici 9. Dobivena je statistički značajna razlika između B i O odnosno AB i O fenotipova ( $p=0,041$  odnosno  $p=0,001$ ). Iz vrijednosti OR-a i 95 %-tnih intervala pouzdanosti vidi se da nositelji B (OR 1,94; 95 % CI 1,02-3,66) i AB (OR 3,68; 95 % CI 1,62-8,39) krvne grupe u usporedbi s onima koji su O krvne grupe imaju veću vjerojatnost obolijevanja od PE-a. Osobe s krvnom grupom A nemaju značajno veću vjerojatnost rizika od PE-a od onih s krvnom grupom O ( $p=0,097$ ; OR 1,57; 95 % CI 0,92-2,69).

Tablica 9. Statistička analiza usporedbe ABO fenotipova osoba s krvnim grupama A, B i AB u odnosu na osobe s O krvnom grupom

ABO fenotip	Skupina ispitanika	Kontrolna skupina	p	OR	95 % CI
A	43	115	0,097	1,57	0,92 - 2,69
B	23	50	0,041	1,94	1,02 - 3,66
AB	14	16	0,001	3,68	1,62 - 8,39
O	29	122		-	

p - vrijednost određena  $\chi^2$  testom, OR - omjer izgleda, 95 % CI - 95%-tni interval pouzdanosti

#### 4.1.5. Statistička analiza usporedbe ABO genotipova između skupine ispitanika i kontrolne skupine

U Tablici 10 prikazana je usporedba ABO genotipova u odnosu na nositelje genotipa OO. Statistički značajna razlika dokazana je između A1A1, BB te A1B genotipa i OO genotipa ( $p=0,023$ ,  $0,005$  te  $0,002$ ). Izračunom OR-a dobiveno je da osobe s A1A1 genotipom imaju otprilike trostruko veću vjerojatnost (OR 3,16; 95 % CI 1,21-8,19) obolijevanja od PE-a od osoba s OO genotipom, pojedinci s BB genotipom deseterostruko veću (OR 10,52; 95 % CI 1,94-56,95) te oni s A1B genotipom četverostruko veću (OR 4,21; 95 % CI 1,76-10,03).

S druge strane, nije dobivena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova koji imaju jedan O ili A2 alel u odnosu na OO genotip između oboljelih od PE-a i zdravih osoba.

Tablica 10. Statistička analiza usporedbe ne-OO ABO genotipova i OO genotipa

ABO genotip	Skupina ispitanika	Kontrolna skupina	p	OR	95 % CI
O1A1	27	82	0,289	1,39	0,76 - 2,51
O1A2	3	11	0,736	1,15	0,30 - 4,38
O2A1	1	5	1,000	0,84	0,09 - 7,48
O2A2	-	-	-	-	-
A1A1	9	12	0,023	3,16	1,21 - 8,19
A1A2	3	5	0,202	0,25	0,57 - 11,17
A2A2	-	-	-	-	-
O1B	18	48	0,211	1,58	0,80 - 3,10
O2B	-	-	-	-	-
BB	5	2	0,005	10,52	1,94 - 56,95
A1B	13	13	0,002	4,21	1,76 - 10,03
A2B	1	3	0,581	1,40	0,14 - 13,97
OO	29	122	-	-	-

p - vrijednost određena Fisherovim egzaktnim testom, OR - omjer izgleda, 95 % CI – 95 %-tni interval pouzdanosti



Budući da je mali broj uzoraka u studiji koji su nositelji A2 ili O2 alela, posebno je napravljena analiza s A1 i A2 alelima svrstanim u jednu zajedničku skupinu A alela te uspoređena s O1 i O2 alelima u zajedničkoj skupini O alela. Statistički značajna razlika dobivena je za AA, BB i AB genotipove u usporedbi s OO genotipom ( $p=0,015$ ,  $0,005$  i  $0,004$ ), dok za OA i OB genotipove nema statistički značajne razlike u pojavnosti između skupine ispitanika i kontrolne skupine u odnosu na OO genotip (Tablica 11).

Tablica 11. Statistička analiza usporedbe objedinjenih ABO genotipova i OO genotipa

ABO genotip	Skupina ispitanika	Kontrolna skupina	p	OR	95 % CI
OA	31	98	0,381	1,33	0,75 - 2,36
AA	12	17	0,015	2,97	1,28 - 6,90
OB	18	48	0,211	1,58	0,80 - 3,10
BB	5	2	0,005	10,52	1,94 - 56,95
AB	14	16	0,004	3,68	1,62 - 8,39
OO	29	122		-	

p - vrijednost određena Fisherovim egzaktnim testom, OR - omjer izgleda, 95 % CI – 95 %-tni interval pouzdanosti

Usporedbom svih ABO genotipova bez O alela s onima koji su sastavljeni od jednog ili dva O alela utvrđeno je da osobe čiji genotip nije sastavljen od O alela (A1A1, A1A2, BB, A1B i A2B) imaju otprilike trostruko veću vjerojatnost rizika za razvoj PE-a od osoba koje su naslijedile barem jedan O alel (O1A1, O1A2, O2A1, O1B, O1O1, O1O2) (Tablica 12).

Tablica 12. Statistička analiza usporedbe ABO genotipova bez O alela i s barem jednim O alelom

Aleli	Skupina ispitanika		Kontrolna skupina		p	OR	95 % CI
	N1	Postotak/%	N2	Postotak/%			
samo A i/ili B	31	28	35	12	<0,0001	3,04	1,76-5,25
barem jedan O	78	72	268	88		-	

N1 i N2 - broj sudionika studije, p - vrijednost određena  $\chi^2$  testom, OR - omjer izgleda, 95 % CI – 95 %-tni interval pouzdanosti

## 4.2. Rasprava

Već nekoliko desetljeća krvne grupe ABO sustava proučavaju se kao mogući čimbenik rizika za razvoj VTE-a, ali i infektivnih bolesti te karcinoma (Garraty, 2005). Što se tiče ispitivanja povezanosti ABO sustava s VTE-om, dokazano je da osobe s O krvnom grupom imaju oko 25 % nižu koncentraciju FVIII i vWF-a u cirkulaciji od ostalih, što je objašnjeno utjecajem ABO gena. Ovi glikoproteini na površini imaju vezane ugljikohidratne ostatke koji odgovaraju ABO aglutinogenima. Tako vezani glikani štite vWF od uklanjanja iz cirkulacije procesom proteolize kataliziranim enzimom ADAMTS13 (Hajizadeh i sur., 2016). Stoga pojedinci s A, B i AB krvnim grupama zbog prisustva aglutinogena A i/ili B imaju veće količine FVIII i vWF-a u plazmi. Budući da su spomenuti glikoproteini izravni ili neizravni dijelovi koagulacijske kaskade, veća je sklonost nastanku ugrušaka u nositelja ne-O krvnih grupa (Crous-Bou i sur., 2017). U studiji koju su proveli Murray i sur. na uzorcima tkiva 35 osoba, koje su umrle uslijed PE-a, imunohistokemijskom analizom *post mortem* utvrđeno je da nositelji ne-O krvne grupe imaju više vWF-a na površini plućnih endotelnih stanica od onih s O krvnom grupom, što je potencijalno posljedica obilnije sinteze i/ili sekrecije ove molekule. Uzorci s barem jednim O alelom imali su manje količine vWF-a od uzoraka bez O alela (Murray i sur., 2019). Dakle, osim što povećanje plazmatske koncentracije čimbenika vWF, a posljedično i FVIII, u osoba s ne-O krvnim grupama doprinosi većoj sklonosti razvoju ugrušaka, na povećan rizik od PE-a utječe i veća količina vWF-a na stijenkama plućnih krvnih žila.

Najnovija studija Warda i sur. iz 2020. donosi nove poglede na utjecaj ABO krvnih grupa na trombocite i na formaciju krvnog ugruška na mjestima vaskularne ozljede. Proučavani su molekularni mehanizmi utjecaja ABO sustava na čimbenik vWF, koji su većim dijelom posredovani preko ABH ugljikohidratnih struktura N- i O- vezanih glikana na vWF-u, kao i ugljikohidratnih struktura izloženih na površinama različitih trombocitnih glikoproteinskih receptora. To podupire hipotezu da ABO krvna grupa, ne samo da utječe na kvantitativne i kvalitativne vrijednosti vWF-a, nego također može utjecati na specifične aspekte funkcije trombocita. (Ward i sur., 2020). Međutim, regulacija vWF-a nije jedini mehanizam kojim ABO krvne grupe doprinose povećanoj sklonosti razvoju ugrušaka. Pod utjecajem enzima koje kodira ABO gen jesu i neke molekule koje su dio upalnog procesa, kao što su E- i P-selektin, ICAM-1 i TNF- $\alpha$ , čiji porast znači veću podložnost upalnim reakcijama, što, između ostalog, može uzrokovati oštećenje endotelnih stanica krvnih žila. U svrhu popravljivanja nastale štete potiče se nakupljanje trombocita i proces zgrušavanja. U procesu agregacije trombocita sudjeluju GPIb-IX-V i GPIIb-IIIa, trombocitni glikoproteinski receptori

koji na površini imaju ABO aglutinogene. Stoga se misli da krvne grupe, utjecanjem na funkciju trombocita, reguliraju primarnu hemostazu (Wolpin i sur., 2010; Yamamoto i sur., 2012; Ward i sur., 2020). Dakle, još uvijek nije u potpunosti jasno kojim sve procesima ABO krvna grupa utječe na pojačanu sklonost zgrušavanju odnosno nastanku trombotskih epizoda. Traga se za daljnjim objašnjenjima veze ABO sustava s venskim tromboembolijama, pa tako i PE-om, koje predstavljaju značajan uzrok smrtnosti.

U ovom radu provedena je retrospektivna studija o povezanosti ABO krvnih grupa i PE-a u hrvatskoj populaciji na uzorku skupine 109 ispitanika s postavljenom dijagnozom PE-a i kontrolne skupine od 303 dobrovoljna darivatelja krvi bez koagulacijski poremećaja u povijesti bolesti. Rezultati su pokazali da osobe s ne-O krvnim grupama imaju skoro dvostruko veći rizik razvoja PE-a od nositelja O krvne grupe (OR 1,86; 95 % CI 1,15-3,01). Može se reći da su u skladu s rezultatima ranijih ispitivanja, od kojih su neke studije ispitivale samo utjecaj fenotipa ABO na razvoj PE-a, dok novije studije ispituju i ABO genotipove, što je detaljnije i daje više podataka za usporedbu. Tako su, kako je ranije spomenuto, Wolpin i sur. dokazali da je otprilike dva puta veća vjerojatnost da nositelji fenotipa ne-O krvne grupe razviju idiopatsku PE u usporedbi s nositeljima O krvne grupe (Wolpin i sur., 2010). Nadalje, usporedbom A, B i AB krvnih grupa s O krvnom grupom u ovoj studiji dobiveno je da B krvna grupa ima otprilike dvostruko veću vjerojatnost razviti PE u odnosu na O, a AB čak oko tri i pol puta veću (OR 1,94, 95 % CI 1,02-3,66; OR 3,68, 95 % CI 1,62-8,39). Prema tome, može se reći da B alel nosi rizik za razvoj PE-a. Iako je izgledno da A alel također povećava rizik obolijevanja, osobe s krvnom grupom A ipak nisu pokazale statistički značajnu razliku u nastanku PE-a od osoba s krvnom grupom O (OR 1,57; 95 % CI 0,92-2,69), što nije u skladu s ostalim već spomenutim studijama. Wolpin i sur. izvijestili su da nositelji svih ne-O krvnih grupa, A, B i AB, imaju skoro dvostruko veći rizik u odnosu na nositelje O krvne grupe (OR 1,86; OR 1,90; OR 1,78) (Wolpin i sur., 2010). Uspoređujući učestalost ABO genotipova utvrđeno je da A1A1, A1B i BB genotipovi imaju znatno veću vjerojatnost da će u životu razviti PE od OO genotipa (OR 3,16, 95 % CI 1,21-8,19; OR 4,21, 95 % CI 1,76-10,03; OR 10,52, 95 % CI 1,94-56,95). A1B genotip ima veći rizik od A1A1, dok BB genotip ima najveći rizik u odnosu na OO genotip, čak deseterostruko veći. Pretpostavka da O alel ne pridonosi povećanom riziku od PE-a dokazana je usporedbom svih ispitanika koji nisu nositelji O alela i onih koji imaju barem jedan O alel. Izračunom je utvrđeno da osobe bez O alela imaju otprilike trostruko veći rizik razviti PE od osoba koje su nositelji barem jednog O alela (OR 3,04, 95 % CI 1,76-5,25).

Da O krvna grupa, odnosno O alel, ne doprinosi povećanju količine čimbenika vWF-a i FVIII dokazano je puno ranije u studiji O'Donnella i sur. na 158 zdravih dobrovoljaca britanskog podrijetla, nositelja A i O krvnih grupa. Autori su ispitali je li utjecaj ABO krvne grupe na vrijednosti vWF čimbenika posredovan ABH antigenim determinantama smještenim na N-glikanima vWF-a. Utvrdili su da osobe s O krvnom grupom imaju najmanju razinu ukupnog vWF-a. Nositelji A1A1 genotipa imali su najviše vWF-a u cirkulaciji, A1O1 značajno manje, a O1O1 najmanje, što znači da O1 alel ne doprinosi većoj količini vWF-a, pa tako niti povećanom riziku od tromboembolija (O'Donnell i sur., 2002).

Jukić i sur. su 2009., ispitavši povezanost ABO genotipova i rizika od tromboze kod bolesnika s dijagnozom VTE-a u hrvatskoj populaciji, također došli do zaključka da je rizik veći u nositelja ne-OO genotipova krvnih grupa nego u nositelja OO genotipova. Njihovi rezultati pokazali su da B alel najviše doprinosi riziku od tromboze, što je konzistentno s rezultatom sadašnjeg rada, slijedi A1, a A2 i O aleli ne utječu na rizik. S obzirom da u hrvatskoj populaciji nije previše zastupljen A1A1 genotip, autori nisu ni utvrdili rizik za nositelje između skupine ispitanika i kontrolne skupine, dok genotipovi O1A1/O2A1 imaju skoro duplo veći rizik od pojave trombotskih ugrušaka (OR 1,95). Najviše su riziku od tromboze doprinijeli genotipovi A1B/A2B (OR 2,73). Srećom, nositelja tih genotipova ima najmanje u Hrvatskoj (Jukić i sur., 2009). Ovi rezultati dijelom se razlikuju od dobivenih u našoj studiji, a razlog tome može biti što je u studiji iz 2009. bilo značajno manje slučajeva s PE-om među ukupno 60 pacijenata s VTE-om. Naime, rezultatima naše studije utvrđeno je da A1A1 genotip ima tri puta veći rizik od PE-a u usporedbi s OO genotipom. Također, za razliku od Jukić i sur., nije dobivena statistički značajna razlika između O1A1, O2A1 i O1A2 genotipova i OO genotipa te je najviši rizik od PE-a imao BB genotip.

U GWAS (engl. genome-wide association study) studiji Tregoueta i sur. iz 2009. provedenoj na više od 1700 bolesnika i 1400 kontrolnih ispitanika dokazano je da osobe s krvnim grupama O i A2 imaju manji rizik od obolijevanja od VTE-a u odnosu na druge krvne grupe (Tregouet, 2009; Yamamoto i sur., 2012). U skladu s navedenim, rezultati našeg rada ne pokazuju statistički značajnu razliku u pojavnosti genotipova koji imaju jedan O ili A2 alel u odnosu na OO genotip između oboljelih od PE-a i zdravih pojedinaca. Stoga se može zaključiti da O i A2 aleli ne povećavaju sklonost razvoju PE-a.

Vasan i sur. 2016. proveli su veliku prospektivnu studiju na 1 112 072 švedskih i danskih darivatelja krvi iz skandinavske baze podataka SCANDAT2 prikupljajući informacije o obolijevanju od venskih tromboembolija u razdoblju od 20-ak godina. U radu je obuhvaćeno 3302 dobrovoljnih darivatelja krvi oboljela od PE-a. Cilj im je bio ispitati

povezanosti venskih i arterijskih tromboembolijskih događaja s krvnim grupama ABO sustava. Utvrdili su da ne-O krvne grupe imaju otprilike dvostruko veću vjerojatnost rizika od PE-a, za DVT neznatno veću, u usporedbi s O krvnom grupom. Trudnice su pokazale rizik nešto viši od dva puta pri usporedbi ne-O i O krvnih grupa. Pojedinačnim usporedbama A1, A1B, A2 i A2B krvnih grupa s O krvnom grupom primijećeno je da A1 alel doprinosi povećanom riziku od VTE-a, dok A2 alel ne uzrokuje drugačiji rizik za PE od O alela, što se slaže s rezultatima ove studije. Od ne-O krvnih grupa najveći rizik za VTE imali su A1B i A2B genotipovi. Međutim, to nije u skladu s rezultatima ove studije po kojoj BB genotip nosi najveći rizik. Osim toga, autori su dokazali da ABO krvne grupe manje doprinose vjerojatnosti nastanka rekurentne PE, nego incidentalne PE (Vasan i sur., 2016).

U retrospektivnoj studiji objavljenoj 2016. Hajizadeh i sur. su na uzorku od 230 Iranaca, kojima je potvrđena dijagnoza PE-a, također, ispitali jesu li ABO fenotipovi povezani s nastankom PE-a, usporedbom pacijenata prema dvije kontrolne skupine. Jedna kontrolna skupina sastojala se od 81 970 darivatelja krvi bez povijesti kardiovaskularnih bolesti. Budući da su smatrali da darivatelji krvi nisu baš reprezentativni uzorak ispitivane populacije, druga kontrolna skupina uključila je 256 asimptomatskih zdravstvenih radnika. Međutim, u statističkoj usporedbi rezultati se nisu značajno razlikovali između dvaju kontrolnih skupina. Utvrđeno je da je A krvna grupa značajno češća u skupini ispitanika nego u kontrolnim skupinama, dok je krvna grupa O bila najmanje zastupljena u oboljelih od PE u odnosu na kontrolne skupine. Osim toga, autori su istražili ima li spol utjecaj na smrtnost od PE-a s obzirom na ABO krvnu grupu. Dobiveno je da muškarci nositelji O krvne grupe imaju značajno veću stopu smrtnosti u odnosu na ostale ispitanike, što bi moglo značiti da bolesnici s O krvnom grupom imaju lošiji ishod iako imaju manji rizik obolijevanja od PE-a. Međutim, studija je provedena na malom broju ispitanika i jedina je navela ovaj podatak pa je to potrebno provjeriti daljnjim istraživanjima (Hajizadeh i sur., 2016).

Stowell i sur. izvijestili su 2019. o studiji provedenoj na 11 673 ispitanika kojom je dokazano da su koncentracije vWF-a i FVIII najviše u B i AB krvnim grupama, nakon kojih slijede A1, A1A2, A2 te O. Nadalje, autori navode da homozigotni nositelji AA odnosno BB imaju veću količinu ovih glikoproteina od heterozigotnih AO odnosno BO, iz čega se može pretpostaviti da homozigoti imaju veći rizik razvoja PE-a nego heterozigoti (Song i sur., 2015; Stowell i sur., 2019). Dakle, taj podatak u skladu je s rezultatima ovog rada prema kojima nije dokazana statistički značajna razlika između skupine ispitanika i kontrolne skupine usporedbom AO i BO nositelja s OO nositeljima.

S druge strane, Kullab i sur. iste godine u retrospektivnoj studiji provedenoj na 492 bolesnika, u kojoj je ispitana povezanost ABO krvnih grupa i rizika od VTE-a u saudijskoj populaciji, nisu dobili statistički značajnu razliku između nositelja ne-O i O krvnih grupa (Kullab i sur., 2019).

Groot i sur. ispitali su povezanost ABO krvnih grupa i određenih kardiovaskularnih bolesti na 406 755 ispitanika bijele rase britanskog podrijetla, od toga 5776 bolesnika s PE-om. U studiju nisu uključili ispitanike AB krvne grupe zbog male zastupljenosti. Nositelji ne-O (A i B) krvne grupe imali su jedan i pol puta veći rizik od O nositelja. Budući da autori nisu ispitali utjecaj AB krvne grupe, iako je rizik nešto niži, rezultat se relativno slaže s rezultatom ovog rada. Između A i B nositelja nije pronađena razlika u utjecaju na rizik od PE-a, odnosno jednako doprinose povećanju rizika (Groot i sur., 2020). S druge strane, u ovom radu utvrđen je povećan rizik za B, no ne i za A nositelje.

Kosta i sur. 2020. su retrospektivnom studijom provedenoj na po 420 slučajeva i kontrolnih ispitanika, bijelaca europskog podrijetla, ispitali kakav je utjecaj aktivnosti A i B glikoziltransferaza na plazmatsku koncentraciju vWF-a i FVIII te rizik od tromboembolije. Francuska studija je po prvi put pokazala da je aktivnost glikoziltransferaza viša u kontrolnoj skupini od skupine bolesnika neovisno o krvnoj grupi, no vWF-a i FVIII bilo je više u plazmi pacijenata. Dakle, količina čimbenika ne korelira pozitivno s aktivnosti enzima. Znači li to da povišene koncentracije vWF-a i FVIII nisu posljedica smanjene proteolize uslijed glikozilacije ugljikohidratnim ostacima A i B aglutinogena te da neki drugi mehanizam regulira količine ovih molekula u krvnoj plazmi? Nastale sumnje potrebno je ispitati daljnjim istraživanjima. Također, autori su potvrdili da je aktivnost glikoziltransferaza veća u ABO homozigota nego u heterozigota, iz čega se može zaključiti da aleli zbirno doprinose aktivnosti enzima (Kosta i sur., 2020).

Uz ABO krvnu grupu, navode se još neke genetske mutacije kao čimbenici rizika za razvoj VTE-a, pa tako i PE-a. Najčešći uzroci nasljedne trombofilije su FVL mutacija i protrombin G20210A (Crous-Bou i sur., 2017). Jukić i sur. utvrdili su da osobe s ne-OO krvnom grupom i heterozigotnom FVL mutacijom imaju deset puta veći rizik za razvoj tromboze od onih pojedinaca koji su OO krvne grupe i nisu nositelji FVL mutacije te da se među nositeljima OO genotipa čak trideset puta povećava rizik uz prisutnost FVL mutacije (Jukić i sur., 2009).

Osim genetskih mutacija, određeni okolišni čimbenici mogu povećati rizik od VTE-a. Uz već sigurno utvrđene čimbenike rizika, kao što su velike traume i operacije, imobilizacija, karcinomi, trudnoća i akutne infekcije, dokazano je da pretilost više od dva puta povećava

vjerojatnost razvoja VTE-a, a hipertenzija i šećerna bolest oko jedan i pol puta. Još uvijek je nekonzistentno imaju li pušači veći rizik u odnosu na nepušače (Wolpin i sur., 2010; Crous-Bou i sur., 2017). Nadalje, u mlađoj dobi češće obolijevaju žene, što se pripisuje trudnoći i primjeni oralne kontracepcije, dok su u starijoj dobi više pogođeni muškarci. Ako žena uzima oralnu kontracepciju ili hormonsku terapiju i uz to je nositeljica FVL mutacije, ima višestruko veći rizik za razvoj VTE-a (Crous-Bou i sur., 2017). Stoga prilikom ispitivanja rizika nastanka VTE-a, kao i PE-a, u obzir treba uzeti sve čimbenike rizika da bi se dobio što bolji uvid u mogućnosti mjera prevencije i liječenja.

Nekoliko je ograničenja ove studije. Prvo, ova retrospektivna studija obuhvatila je relativno mali broj ispitanika, a da bi se dobio što vjerodostojniji rezultat poželjno je imati što veći uzorak na kojem se istraživanje provodi. Također, udio pojedinih ABO krvnih grupa u kontrolnoj skupini donekle se razlikuje od raspodjele udjela u hrvatskoj populaciji. Najzastupljenija krvna grupa u Hrvatskoj je A s udjelom 42 %, dok je u kontrolnoj skupini u ovome istraživanju O s udjelom 40 % (www.hztn.hr). Osim toga, u radu je promatran samo utjecaj ABO krvnih grupa kao čimbenika rizika, a u obzir nisu uzeti ostali čimbenici koji bi mogli doprinijeti razvoju PE-a.

Konačno, u radu je dokazano da su osobe s ne-O krvnom grupom podložnije razvoju PE-a od nositelja O krvne grupe. Usporedbom ABO fenotipova dobiveno je da nositelji AB imaju najveći rizik, zatim slijede B nositelji, a za A nositelje nije dokazana statistički značajna razlika. Uz to, analizom ABO genotipova utvrđeno je da BB genotip ima deseterostruko veći rizik, A1B četverostruko te A1A1 trostruko od OO genotipa. Genotipovi koji sadrže jedan O ili A2 alel nisu pokazali statistički značajnu razliku u odnosu na OO genotip.

Broj bolesnika kojima je postavljena dijagnoza PE-a porastao je tijekom godina (Park i sur., 2009). Bilo da je to posljedica veće izloženosti okolišnim čimbenicima rizika, drugačijeg stila života, primjene boljih dijagnostičkih metoda, dostupnijih zdravstvenih usluga ili kombinacije sveg navedenog, potrebno je pravovremeno poduzeti adekvatne mjere prevencije u svrhu sprječavanja razvoja patološkog stanja. Koji se sve mehanizmi kriju iza različite sklonosti bolesnika razvoju PE-a, nije u potpunosti poznato. Stoga su nužna daljnja istraživanja u ovom području kako bi se utvrdilo ima li uvođenje pretrage ABO genotipizacije, kao genetičkog čimbenika za razvoj PE-a, kliničko značenje.



## 5. ZAKLJUČAK

- Cilj ovog rada bio je ispitati postoji li povezanost između genotipova ABO sustava krvnih grupa i razvoja PE-a u hrvatskoj populaciji. Provedenom retrospektivnom studijom o skupinama od 109 bolesnika s dijagnozom PE-a i 303 kontrolna ispitanika dokazano je da postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti ne-O fenotipova i O fenotipa između skupine bolesnika i kontrolne skupine ( $p=0,011$ ). Izračunom omjera izgleda dobivena je vjerojatnost obolijevanja otprilike dvostruko veća u nositelja ne-O krvne grupe (OR 1,86; 95 % CI 1,15-3,01).
- Utvrđeno je da se B i AB krvne grupe po zastupljenosti statistički značajno razlikuju od O krvne grupe među ispitanim skupinama ( $p=0,041$  i  $p=0,001$ ) uz omjere izgleda 1,94 (95 % CI 1,02-3,66) te 3,68 (95 % CI 1,62-8,39), dok za A krvnu grupu nema značajne razlike ( $p=0,097$ ).
- Nositelji A1A1, A1B i BB genotipova imaju veću vjerojatnost razviti PE od OO genotipa (OR 3,16; OR 4,21; OR 10,52) te navedeni genotipovi predstavljaju čimbenike rizika za razvoj PE-a u ispitanjoj skupini hrvatske populacije.
- B alel najviše doprinosi povećanju rizika nastanka ugrušaka, iza kojeg slijedi A1. Nije dobivena statistički značajna razlika u zastupljenosti genotipova koji se sastoje od jednog O ili A2 alela u odnosu na OO genotip između bolesnika i zdravih osoba, stoga ovi aleli ne utječu značajno na rizik od trombotskog događaja.
- Usporedbom svih genotipova koji ne sadrže O alel s onima koji su sastavljeni od barem jednog O alela, dobivena je značajna razlika u učestalosti ( $p<0,0001$ ) te je dokazano da je vjerojatnost razvoja PE-a trostruko veća u nositelja isključivo A i/ili B alela (OR 3,04; 95 % CI 1,76-5,25).
- Rezultati ovoga istraživanja u skladu su s drugim studijama u kojima se također potvrdila povezanost pojedinih ne-O krvnih grupa s razvojem PE-a kod bolesnika. Međutim, unatoč brojnim provedenim studijama još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi kojima ABO sustav krvnih grupa utječe na razvoj tromboembolija. Budućim istraživanjima preostaje utvrditi ima li ABO genotipizaciji mjesta među laboratorijskim pretragama u svrhu pravovremene prevencije i uspješnijeg liječenja kako PE-a, tako i ostalih venskih tromboembolija.

## 6. LITERATURA

Anderson FA, Spencer FA. Risk Factors for Venous Thromboembolism. *Circulation*, 2003, 107, 9-16.

Anstee DJ. The relationship between blood groups and disease. *Blood*, 2010, 115(23), 4635-4643.

Bingulac-Popović J. Radna uputa „ABO genotipizacija“ (RU-OMD-009). Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Odjel za molekularnu dijagnostiku, Zagreb, 2020.

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

Cid E, de la Fuente S, Yamamoto M, Yamamoto F. ABO in the Context of Blood Transfusion and Beyond. U: Blood Transfusion in Clinical Practice. Kochhar P, urednica, London, IntechOpen, 2012, str. 3-22.

Crous-Bou M, Harrington LB, Kabrhel C. Environmental and genetic risk factors associated with venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost*, 2016, 42(8), 808-820.

Davidson S. Davidson's Principles and Practice of Medicine. 21st Edition. Colledge NR, Walker BR, Ralston SH, urednici, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto, Elsevier, 2010, str. 1004.

Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens. Bethesda (US), National Center for Biotechnology Information, 2005, str. 31-47.

Essien EO, Rali P, Mathai SC. Pulmonary Embolism. *Med Clin N Am*, 2019, 103, 549–564.

Ewald DR, Sumner SCJ. Blood Type Biochemistry and Human Disease. *WIREs Syst Biol Med*, 2016, 8, 517–535.

Franchini M, Makris M. Non-O blood group: an important genetic risk factor for venous thromboembolism. *Blood Transfus*, 2013, 11, 164-165.

Garratty G. Relationship of blood groups to disease: do blood group antigens have a biological role? *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 2005, 43(1), 113-121.

Gassner C, Schmarda A, Nussbaumer W, Schonitzer D. ABO Glycosyltransferase Genotyping by Polymerase Chain Reaction Using Sequence-Specific Primers. *Blood*, 1996, 88(5), 1852-1856.

Gorakshakar A, Gogri H, Ghosh K. Evolution of technology for molecular genotyping in blood group systems. *Indian J Med Res*, 2017, 146(3), 305–315.

Groot HE, Villegas Sierra LE, Said MA, Lipsic E, Karper JC, van der Harst P. Genetically Determined ABO Blood Group and its Associations With Health and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40, 830–838.

Hajizadeh R, Kavandi H, Nadiri M, Ghaffari S. Association of ABO blood group with incidence and outcome of acute pulmonary embolism. *Turk Kardiyol Dern Ars*, 2016, 44(5), 397-403.

Hoffbrand AV, Moss PAH. Hoffbrand's Essential Haematology. West Sussex, UK, John Wiley & Sons Ltd, 2016, str. 333-336.

Jukić I, Bingulac-Popović J, Đogić V, Babić I, Culej J, Tomičić M, Vuk T, Šarlija D, Balija M. ABO Blood Groups and Genetic Risk Factors for Thrombosis in Croatian Population. *Croat Med J*, 50(6), 550-558.

Jukić I, Bingulac-Popović J, Đogić V, Hećimović A, Babić I, Batarilo I, Maglov C, Šturm D. Evaluation of ABO blood groups as a risk factor for myocardial infarction. *Blood Transfus*, 2013, 11, 464-465.

Konecny F. Inherited thrombophilic states and pulmonary embolism. *JRMS*, 2009, 14(1), 43-56.

Kosta MI, Bailly P, Silvy M, Saut N, Suchon P, Morange PE, Chiaroni J, Trégouët DA, Goumidi L. ABO blood group, glycosyltransferase activity and risk of Venous Thrombosis. *bioRxiv*, 2020, <https://doi.org/10.1101/2020.03.01.971754>.

Kullab GJ, Zaidi ARZ, MBBS, Albaqmi S, Alajlan H, Alsheef MA. ABO Blood Groups and the Risk of Venous Thromboembolism (VTE) Among Saudi Patients at a Tertiary Care Hospital in Riyadh. *Blood*, 2019, 134, 4926.

Kundid R, Radna uputa „Elektroforeza“ (RU-OMD-011). Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Odjel za molekularnu dijagnostiku, Zagreb, 2019.

Kundid R. Radna uputa „QIAcube izolacija nukleinskih kiselina“ (RU-OMD-033). Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Odjel za molekularnu dijagnostiku, Zagreb, 2018.

Kundid R, Vukičević A. Radna uputa „Snimanje gelova“ (RU-OMD-012). Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Odjel za molekularnu dijagnostiku, Zagreb, 2019.

Labar B, Hauptmann E i sur. Hematologija, Zagreb, Školska knjiga, 2007, str. 67, 322-325, 337-338.

Murray GP, Post SR, Post GR. ABO blood group is a determinant of von Willebrand factor protein levels in human pulmonary endothelial cells. *J Clin Pathol*, 2019, 0, 1–3.

O'Donnell J, Boulton FE, Manning RA, Laffan MA. Amount of H Antigen Expressed on Circulating von Willebrand Factor Is Modified by ABO Blood Group Genotype and Is a Major Determinant of Plasma von Willebrand Factor Antigen Levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22, 335-341.

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

O krvi, <https://www.hztm.hr>, pristupljeno 25.8.2020.

Park B, Messina L, Dargon P, Huang W, Ciocca R, Anderson FA. Recent Trends in Clinical Outcomes and Resource Utilization for Pulmonary Embolism in the United States: Findings From the Nationwide Inpatient Sample. *CHEST*, 2009, 136, 983–990.

Prandoni P, Noventa F, Ghirarduzzi A, Pengo V, Bernardi E. The risk of recurrent venous thromboembolism after discontinuing anticoagulation in patients with acute proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism. A prospective cohort study in 1,626 patients. *Haematologica*, 2007, 92, 199-205.

Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology, 2019., <https://www.isbtweb.org>, pristupljeno 20.8.2020.

Song J, Chen F, Campos M, Bolgiano D, Houck K, Chambless LE, Wu KK, Folsom AR, Couper D, Boerwinkle E, Dong J. Quantitative Influence of ABO Blood Groups on Factor VIII and Its Ratio to von Willebrand Factor, Novel Observations from an ARIC Study of 11,673 Subjects. *PLoS ONE*, 2015, 10(8), e0132626.

Spiezia L, Campello E, Bon M, Tison T, Milan M, Simioni P, Prandoni P. ABO blood groups and the risk of venous thrombosis in patients with inherited thrombophilia. *Blood Transfus*, 2013, 11, 250-253.

Stowell SR, Stowell CP. Biologic roles of the ABH and Lewis histo-blood group antigens part II: thrombosis, cardiovascular disease and metabolism. *Vox Sanguinis*, 2019, 114, 535–552.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL. Biokemija. Zagreb, Školska knjiga, 2013, str. 315

Šimundić AM. Osobitosti usporedbe nebrojčanih podataka. U: Osnove biostatistike u svakodnevnoj praksi. Nikolac N, urednica, Zagreb, Hrvatska komora medicinskih biokemičara, Medicinska naklada, 2008, str. 22-29.

Tan SY, Graham C. Karl Landsteiner (1868–1943): Originator of ABO blood classification. *Singapore Med J*, 2013, 54(5), 243-244.

Trégouet DA, Heath S, Saut N, Biron-Andreani C, Schved JF, Pernod G, Galan P, Drouet L, Zelenika D, Juhan-Vague I, Alessi MC, Tiret L, Lathrop M, Emmerich J, Morange PE. Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. *Blood*, 2009, 113(21), 5298-5303.

Vasan SK, Rostgaard K, Majeed A, Ullum H, Titlestad KE, Pedersen OBV, Erikstrup C, Nielsen KR, Melbye M, Nyrén O, Hjalgrim H, Edgren G. ABO Blood Group and Risk of Thromboembolic and Arterial Disease. *Circulation*, 2016, 133, 1449-1457.

Vuk Pisk S, Vuk T, Ivezić E, Jukić I, Bingulac-Popović J, Filipčić I. ABO blood groups and psychiatric disorders: a Croatian study. *Blood Transfus*, 2019, 17, 66-71.

Ward S, O'Sullivan J, O'Donnell J. The relationship between ABO blood group, von Willebrand factor and primary hemostasis. *Blood*, 2020.

Wolpin BM, Chan AT, Hartge P, Chanock SJ, Kraft P, Hunter DJ, Giovannucci EL, Fuchs CS. ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101(6), 424-431.

Wolpin BM, Kabrhe C, Varraso R, Kraft P, Rimm EB, Goldhaber SZ, Camargo Jr. CA, Fuchs CS. Prospective study of ABO blood type and the risk of pulmonary embolism in two large cohort studies. *Thromb Haemost*, 2010, 104, 962-971.

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

Yamamoto F, Cid E, Yamamoto M, Blancher A. ABO Research in the Modern Era of Genomics. *Transfus Med Rev*, 2012, 26(2), 103-118.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

### 7.1. Sažetak

Nositelji različitih krvnih grupa ABO sustava imaju drugačije koncentracije koagulacijskih čimbenika vWF i FVIII u krvnoj plazmi. Dosadašnjim istraživanjima dokazano je da ne-O krvne grupe doprinose većem riziku razvoja plućne embolije (PE). Cilj ove studije bio je ispitati povezanost ABO fenotipova, genotipova i alela s PE-om u hrvatskoj populaciji. Retrospektivna studija provedena je na 109 bolesnika s dijagnozom PE-a i 303 dobrovoljna darivatelja krvi bez koagulacijskih bolesti. Iz uzorka pune krvi izolirana je genomski DNA pomoću QIAamp DNA Blood Mini kiti na QIAcube uređaju (QIAGEN, Njemačka). ABO genotipizacija provedena je “*in house*” PCR-SSP metodom na uređaju ABI 2720 (Applied Biosystems, SAD). Statističkom usporedbom dobivena je 1,86 puta veća vjerojatnost obolijevanja od PE u nositelja ne-O krvnih grupa (OR 1,86; 95 % CI 1,15-3,01). Utvrđeno je da B i AB krvne grupe najviše pridonose riziku uz omjere izgleda 1,94 te 3,68, dok za A krvnu grupu nema statistički značajne razlike ( $p=0,097$ ). Nositelji genotipova A1A1, A1B i BB imaju veću vjerojatnost razviti PE od OO genotipa (OR 3,16, 95 % CI 1,21-8,19; OR 4,21, 95 % CI 1,75-10,03; OR 10,52, 95 % CI 1,94-56,95), stoga navedeni genotipovi predstavljaju čimbenike rizika za razvoj PE-a u hrvatskoj populaciji. B alel najviše doprinosi povećanju rizika, slijedi A1, dok O i A2 aleli ne utječu značajno na rizik. Dokazana je trostruko veća vjerojatnost razvoja PE u nositelja samo A i/ili B alela (OR 3,04; 95 % CI 1,76-5,25) u usporedbi s nositeljima barem jednog O alela. Rezultati ove studije u skladu su sa sličnim objavljenim istraživanjima te potvrđuju da su ne-O krvne grupe genetički čimbenik rizika za razvoj PE-a. Budućim istraživanjima treba u potpunosti razjasniti mehanizam kojim ABO sustav krvnih grupa utječe na razvoj PE-a.

**Ključne riječi:** krvne grupe ABO sustava, von Willebrandov čimbenik, plućna embolija, ABO genotipizacija

## 7.2. Summary

Carriers of particular blood types of the ABO system have different concentrations of vWF and FVIII in blood plasma. Previous research has shown that non-O blood types contribute to a higher risk of pulmonary embolism (PE). The aim of this study was to examine the association of ABO phenotypes, genotypes and alleles with PE in the Croatian population. A case-control study was conducted on 109 patients diagnosed with PE and 303 voluntary blood donors without any coagulation disorder as a control group. Genome DNA was isolated from a whole blood sample using the QIAamp DNA Blood Mini kit on a QIAcube device (QIAGEN, Germany). ABO genotyping was performed by “in house” PCR-SSP method on the ABI 2720 device (Applied Biosystems, USA). Statistical analysis has shown a 1.86-fold higher risk of the development of PE in non-O blood type carriers (OR 1.86; 95% CI 1.15–3.01). The strongest association with PE risk has been recorded for B and AB blood types with odds ratios of 1.94 and 3.68, while for blood type A there was no statistically significant difference ( $p = 0.097$ ). Carriers of A1A1, A1B and BB genotypes are more likely to develop PE than OO genotypes (OR 3.16, 95% CI 1.21-8.19; OR 4.21, 95% CI 1.75-10.03; OR 10.52, 95% CI 1.94-56.95). Therefore, these genotypes represent risk factors for the development of PE in the sample of Croatian population. The B allele showed greatest contribution to the risk, followed by A1, while the O and A2 alleles do not significantly affect the risk. Carriers of A and/or B allele proved to be three times more prone to develop PE (OR 3.04; 95% CI 1.76-5.25) compared to carriers of at least one O allele. The results of this study are consistent with recently published studies and confirm that non-O blood types are a genetic risk factor for the development of PE. Future research should fully elucidate the mechanism by which the ABO blood group system influences the development of PE.

**Key words:** ABO blood group system, von Willebrand factor, pulmonary embolism, ABO genotyping



## **8. PRILOZI**

### **8.1. Kratice**

ADAMTS13 = engl. a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 13

CT = računalna tomografija

DNA = deoksiribonukleinska kiselina

dNTP = deoksiribonukleotid-trifosfat

EDTA = etilendiamintetraoctena kiselina

IgG = imunoglobulin G

IgM = imunoglobulin M

UDP = uridin-difosfat

UV = ultraljubičasto zračenje

**9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION  
CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### POVEZANOST GENOTIPOVA ABO SUSTAVA KRVNIH GRUPA S PLUĆNOM EMBOLIJOM U HRVATSKOJ POPULACIJI

Nikolina Parašilovac

#### SAŽETAK

Nositelji različitih krvnih grupa ABO sustava imaju drugačije koncentracije koagulacijskih čimbenika vWF i FVIII u krvnoj plazmi. Dosadašnjim istraživanjima dokazano je da ne-O krvne grupe doprinose većem riziku razvoja plućne embolije (PE). Cilj ove studije bio je ispitati povezanost ABO fenotipova, genotipova i alela s PE-om u hrvatskoj populaciji. Retrospektivna studija provedena je na 109 bolesnika s dijagnozom PE-a i 303 dobrovoljna darivatelja krvi bez koagulacijskih bolesti. Iz uzorka pune krvi izolirana je genomska DNA pomoću QIAamp DNA Blood Mini kita na QIAcube uređaju (QIAGEN, Njemačka). ABO genotipizacija provedena je "in house" PCR-SSP metodom na uređaju ABI 2720 (Applied Biosystems, SAD). Statističkom usporedbom dobivena je 1,86 puta veća vjerojatnost obolijevanja od PE u nositelja ne-O krvnih grupa (OR 1,86; 95 % CI 1,15-3,01). Utvrđeno je da B i AB krvne grupe najviše pridonose riziku uz omjere izgleda 1,94 te 3,68, dok za A krvnu grupu nema statistički značajne razlike ( $p=0,097$ ). Nositelji genotipova A1A1, A1B i BB imaju veću vjerojatnost razviti PE od OO genotipa (OR 3,16, 95 % CI 1,21-8,19; OR 4,21, 95 % CI 1,75-10,03; OR 10,52, 95 % CI 1,94-56,95), stoga navedeni genotipovi predstavljaju čimbenike rizika za razvoj PE-a u hrvatskoj populaciji. B alel najviše doprinosi povećanju rizika, slijedi A1, dok O i A2 aleli ne utječu značajno na rizik. Dokazana je trostruko veća vjerojatnost razvoja PE u nositelja samo A i/ili B alela (OR 3,04; 95 % CI 1,76-5,25) u usporedbi s nositeljima barem jednog O alela. Rezultati ove studije u skladu su sa sličnim objavljenim istraživanjima te potvrđuju da su ne-O krvne grupe genetički čimbenik rizika za razvoj PE-a. Budućim istraživanjima treba u potpunosti razjasniti mehanizam kojim ABO sustav krvnih grupa utječe na razvoj PE-a.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 45 stranica, 2 grafička prikaza, 12 tablica i 47 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: krvne grupe ABO sustava, von Willebrandov čimbenik, plućna embolija, ABO genotipizacija

Mentor: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Jasna Bingulac-Popović**, znanstvena savjetnica, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Jasna Bingulac-Popović**, znanstvena savjetnica, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

**Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### ASSOCIATION OF GENOTYPES OF ABO BLOOD GROUP SYSTEM WITH PULMONARY EMBOLISM IN CROATIAN POPULATION

**Nikolina Parašilovac**

#### SUMMARY

Carriers of particular blood types of the ABO system have different concentrations of vWF and FVIII in blood plasma. Previous research has shown that non-O blood types contribute to a higher risk of pulmonary embolism (PE). The aim of this study was to examine the association of ABO phenotypes, genotypes and alleles with PE in the Croatian population. A case-control study was conducted on 109 patients diagnosed with PE and 303 voluntary blood donors without any coagulation disorder as a control group. Genome DNA was isolated from a whole blood sample using the QIAamp DNA Blood Mini kit on a QIAcube device (QIAGEN, Germany). ABO genotyping was performed by “in house” PCR-SSP method on the ABI 2720 device (Applied Biosystems, USA). Statistical analysis has shown a 1.86-fold higher risk of the development of PE in non-O blood type carriers (OR 1.86; 95% CI 1.15–3.01). The strongest association with PE risk has been recorded for B and AB blood types with odds ratios of 1.94 and 3.68, while for blood type A there was no statistically significant difference ( $p = 0.097$ ). Carriers of A1A1, A1B and BB genotypes are more likely to develop PE than OO genotypes (OR 3.16, 95% CI 1.21-8.19; OR 4.21, 95% CI 1.75-10.03; OR 10.52, 95% CI 1.94-56.95). Therefore, these genotypes represent risk factors for the development of PE in the sample of Croatian population. The B allele showed greatest contribution to the risk, followed by A1, while the O and A2 alleles do not significantly affect the risk. Carriers of A and/or B allele proved to be three times more prone to develop PE (OR 3.04; 95% CI 1.76-5.25) compared to carriers of at least one O allele. The results of this study are consistent with recently published studies and confirm that non-O blood types are a genetic risk factor for the development of PE. Future research should fully elucidate the mechanism by which the ABO blood group system influences the development of PE.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 45 pages, 2 figures, 12 tables and 47 references. Original is in Croatian language.

Keywords: ABO blood group system, von Willebrand factor, pulmonary embolism, ABO genotyping

Mentor: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jasna Bingulac-Popović, Ph.D.** *Scientific Adviser*, Croatian Institute of Transfusion Medicine

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jasna Bingulac-Popović, Ph.D.** *Scientific Adviser*, Croatian Institute of Transfusion Medicine  
**Anita Somborac Bačura, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.