

# Ispitivanje povezanosti između ABO sustava krvnih grupa, bipolarnoga poremećaja i depresije

---

Lehki, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:998503>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



**Matea Lehki**

**Ispitivanje povezanosti između ABO sustava  
krvnih grupa, bipolarnoga poremećaja i  
depresije**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Molekularna dijagnostika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju te Odjelu za molekularnu dijagnostiku Hrvatskoga zavoda za transfuzijsku medicinu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić i dr.sc. Jasne Bingulac-Popović.

*Zahvaljujem svim djelatnicima Odjela za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i asistentu na Zavodu za biofiziku Domagoju Kiferu na pruženoj pomoći, a posebno mentoricama dr. sc. Jasni Bingulac-Popović i prof. dr. sc. Karmeli Barišić na svim stručnim savjetima i pomoći u izradi diplomskog rada.*

*Puno hvala na svakoj podršci i svakom ohrabrenju mojoj obitelji i prijateljima, a najviše mom mužu Karlu.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. ABO sustav krvnih grupa .....	1
1.1.1. Sinteza A i B antigena .....	2
1.1.2. Struktura ABO gena i alela .....	3
1.1.3. ABH tkivni antigeni .....	3
1.2. Bipolarni afektivni poremećaj .....	4
1.3. Depresija .....	5
1.4. Povezanost ABO sustava krvnih grupa i različitih bolesti .....	7
1.4.1. ABO sustav krvnih grupa i zarazne bolesti .....	7
1.4.2. ABO sustav krvnih grupa i kardiovaskularne bolesti .....	8
1.4.3. ABO sustav krvnih grupa i maligne bolesti .....	9
1.4.4. ABO sustav krvnih grupa i afektivni poremećaji .....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	12
3. MATERIJALI I METODE .....	13
3.1. Materijali .....	13
3.1.1. Ispitanici .....	13
3.1.2. Uređaji, pribor i kemikalije .....	14
3.2. Metode .....	16
3.2.1. Izolacija genomske DNA .....	16
3.2.2. ABO genotipizacija .....	17
3.2.3. Statistička obrada podataka .....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	21
4.1. Rezultati .....	21
4.1.1. Usporedba skupine bolesnica i kontrolne skupine po dobi .....	21
4.1.2. Statistička analiza usporedbe ABO fenotipova između skupine bolesnica i kontrolne skupine .....	21
4.1.3. Statistička analiza usporedbe ABO genotipova između skupine bolesnica i kontrolne skupine .....	23
4.1.4. Statistička analiza usporedbe A1, A2, B, O1 i O2 alela između skupine bolesnica i kontrolne skupine .....	24
4.1.5. Usporedba raspodjele ABO fenotipova unutar skupine bolesnica .....	25
4.2. Rasprava .....	27
5. ZAKLJUČCI .....	31
6. LITERATURA .....	32

7. SAŽETAK/SUMMARY.....	36
7.1. Sažetak.....	36
7.2. Summary.....	38
8. PRILOZI.....	40
8.1. Kratice.....	40
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1. UVOD

## 1.1. ABO sustav krvnih grupa

Prvi uspješni pokušaji transfuzije ljudske krvi započeli su u 18. stoljeću, ali transfuzija tada nije bila sigurna zbog nepoznavanja sustava krvnih grupa i uzroka nekompatibilnosti te su neki ljudi umirali zbog njenih posljedica. Tek kada je 1900. godine austrijski patolog Karl Landsteiner otkrio ABO sustav krvnih grupa, započelo je doba veće sigurnosti transfuzije krvi (Cid i sur., 2012.).

Landsteiner je podijelio pojedince na 3 krvne grupe: A, B i C (koja je kasnije nazvana O), a 1902. Decastello i Sturli otkrili su 4. i najrjeđu krvnu grupu - AB. Landsteiner je smatrao da eritrociti sadrže dva različita biljega (A i B), koji mogu reagirati s odgovarajućim serumskim protutijelima (anti-A i anti-B) te da se prisutnost protutijela protiv A i B antigena prirodno javlja kod osoba koje ne izlažu te antigene (Cid i sur., 2012.). Za svoje otkriće dobio je 1930. Nobelovu nagradu (Watkins, 2001.). Konkretnije rečeno, serum osobe s krvnom grupom A sadrži protutijela protiv B antigena te stoga može aglutinirati eritrocite krvne grupe B i AB. Serum nositelja krvne grupe B aglutinira eritrocite krvne grupe A i AB. Serum osoba O fenotipa može aglutinirati eritrocite A, B i AB krvne grupe, dok serum osoba s krvnom grupom AB ne sadrži ni anti-A niti anti-B protutijela (Cid i sur., 2012.).

*Tablica 1. Jednostavna klasifikacija ABO fenotipova i pripadajućih genotipova*

ABO krvna grupa	A/B antigeni na eritrocitima	Anti-A/-B protutijela u serumu	ABO genotip
O	-	Anti-A i Anti-B	O/O
A	A	Anti-B	A/A ili A/O
B	B	Anti-A	B/B ili B/O
AB	A i B	-	A/B

*Preuzeto iz Cid i sur., 2012.*

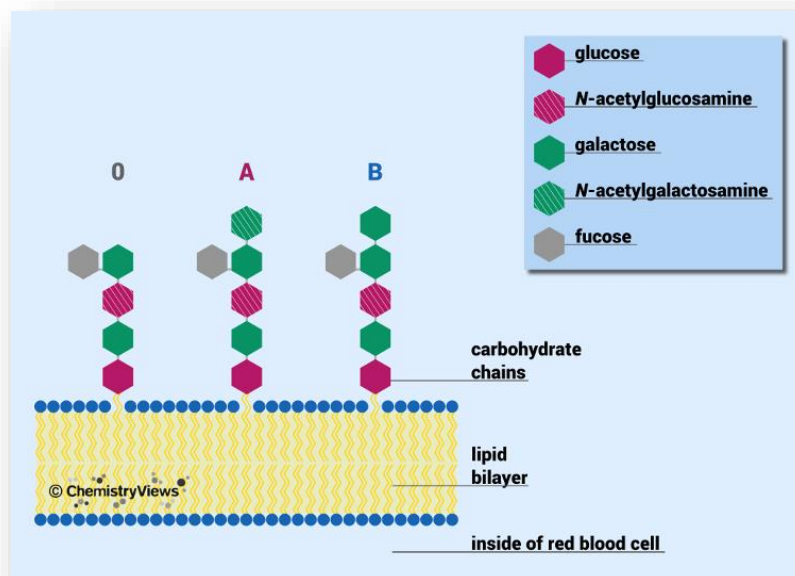
Aleli A, B i O nasljeđuju se prema Mendelovom zakonu na način da su aleli A i B kodominantni, dok je alel O recesivan (Cid i sur., 2012.). Postoji mnogo različitih varijacija, tj. podtipova ta 3 alela, uključujući najčešće A1, A2, A3, Ael, Aint, Am, Aw, Ax, cis-AB, B(A), B, B(3)Bel, Bw, Bx i O (Yamamoto, 2021.).

### 1.1.1. Sinteza A i B antigena

A i B oligosaharidni antigeni ABO sustava krvnih grupa produkt su istog prekursora (antigena H) te nastaju enzimskim reakcijama kataliziranim A- i B-glikoziltransferazama (AT i BT), koje su kodirane funkcionalnim A i B alelima na ABO genskom lokusu (Yamamoto, 2021.). A i B antigeni razlikuju se u zadnjem šećernom ostatku, vezanom  $\alpha$ -1,3-glikozidnim vezom na galaktozu H antigena.

A antigen nastaje prijenosom N-acetil-galaktozamina, kojeg prenosi A-transferaza ( $\alpha$ -1,3-N-acetil-D-galaktozaminiltransferaza), s uridin-difosfat-N-acetil-D-galaktozamina (UDP-GalNac) na fukozilirani galaktozni ostatak H antigena. Slično tome, B-antigen nastaje reakcijom u kojoj B-transferaza ( $\alpha$ -1,3-D-galaktoziltransferaza) prenosi galaktozu s UDP-galaktoze na fukozilirani galaktozni ostatak H antigena. Ove reakcije nastanka A i B antigena, odvijaju se u Golgijevom aparatu (Cid i sur., 2012.).

Dakle, A i B antigeni nisu primarno produkt gena, već A/B aleli kodiraju proteine A/B-glikoziltransferaze, koje kataliziraju zadnji korak biosinteze A/B antigena (Yammamoto, 2012.).



Slika 1. Struktura A, B i H antigena  
Preuzeto sa [www.chemistryviews.org](http://www.chemistryviews.org).

### 1.1.2. Struktura ABO gena i alela

*ABO* gen nalazi se na 'q' kraku kromosoma 9 (9q34). Cijeli lokus obuhvaća preko 18 kb i sastoji se od sedam egzona (Gorakshakar, 2017.). Aleli za A- i B-transferaze razlikuju se u 7 nukleotida na pozicijama 297, 526, 657, 703, 796, 803 i 840, što dovodi do promjene 4 aminokiseline zbog izmjene nukleotida na položaju 526 (C u G: Arg u Gly), 703 (G u A: Gly u Ser), 796 (C u A: Leu u Met) i 803 (G u C; Gly u Ala) (Gassner i sur., 1996.).

Postoje dva alela A, gore spomenuti alel A je A1. Alel A2, u usporedbi s alelom A1, ima supstituciju baze na položaju 467 (C do T: Pro do Leu) i deleciju citozina na položaju 1.059, koja rezultira dodatnom domenom na C-terminalnom kraju zrelog proteina (Gassner i sur., 1996.).

Osobe nositelji O fenotipa imaju genetske kombinacije dva alela O1 i O2 koji su specifični za krvnu grupu O. Alel O1 ima deleciju gvanina u kodirajućoj regiji A1 na položaju 261, što uzrokuje pomak okvira koji stvara stop kodon na položajima nukleotida 352-354. Drugi alel O fenotipa, O2, razlikuje se od A1 na tri nukleotidna položaja: 297, 526 i 802. Samo zamjene na položajima 526 (C u G: Arg u Gly) i 802 (G u A: Gly u Arg) dovode do promjena aminokiselina. Zamjene O2 na položajima 297 i 526 zapravo su iste kao u alelu B.

Određivanjem 5 osnovnih alela (A1, A2, B, O1 i O2) moguće je razlučiti 15 različitih ABO genotipova, a to su: A1O1, A1O2, A1A1, A1A2, A2O1, A2O2, A2A2, O1O1, O1O2, O2O2, BO1, BO2, BB, A1B i A2B (Gassner i sur., 1996.).

### 1.1.3. ABH tkivni antigeni

ABH antigeni otkriveni su kao antigeni na površini eritrocita, no oni su prisutni i u mnogim drugim tkivima. Mogu se pronaći na trombocitima, endotelnim i epitelnim stanicama pluća i gastrointestinalnog trakta te na sluznici mokraćnog i reproduktivnog trakta. Prisutnost ABH antigena stoga je, osim kod transplantacije krvi, važna i kod transplantacije stanica, tkiva ili organa (Cid i sur., 2012.). Neki znanstvenici smatraju da se ABH antigeni trebaju preimenovati u antigene ABH tkivno-krvnih grupa da bi se naglasilo da su primarno tkivni antigeni. To potkrjepljuje činjenica da su se ABH antigeni u evoluciji prije pojavili u ektodermalnim i endodermalnim tkivima nego u mezenhimalnom hematopoetskom tkivu i stanicama



(uključujući eritrocite). Neki tvrde i da su ABH antigeni glavni alogenetski antigeni na najviše epitelnih stanica i da su nađeni na primarnim osjetilnim neuronima (Garraty, 2005.).

Ekspresija ABH antigena u tkivima i tjelesnim tekućinama regulirana je sekretornim genom *FUT2*, koji kodira  $\alpha$ -1,2-fukoziltransferazu koja prenosi L-fukozu na ugljik 2 u galaktozi glikana koji sadrže N-acetil-galaktozamin. Na taj način nastaje H antigen. Iz H antigena mogu nastati A i B antigeni, kako je ranije navedeno, prijenosom N-acetil-D-galaktozamina ili D-galaktoze uz  $\alpha$ -glikozil-transferazu na ugljik 3 istih glikana. U nedostatku aktivnog *FUT2* gena, nastat će  $Le^a$  antigen Lewisovog sustava krvnih grupa. Ukoliko su aktivni i *FUT2* i *FUT3* gen, nastat će  $Le^b$  antigen. Dakle, A i B antigeni mogu nastati u tkivima samo ako je aktivan *FUT2* gen. Osobe koje imaju aktivan *FUT2* gen i koje izlučuju antigene svoje krvne grupe u tjelesne tekućine nazivaju se sekretori, a osobe koje imaju neaktivan *FUT2* gen nazivaju se nesekretori (Anstee, 2010.). U populaciji bijelaca otprilike je 80 % sekretora, a 20 % nesekretora (Watkins, 2001.).

ABO nije jedni sustav krvnih grupa. Danas je poznato 38 sustava krvnih grupa koji se sastoje od više od 300 specifičnih antigena (Gorakshakar, 2017.), a Hirszfeld je pokazao da se frekvencije raspodjele ABO krvnih grupa razlikuju u različitim populacijama (Anstee, 2010.). U Hrvatskoj, 42 % ljudi ima krvnu grupu A, 34 % ima krvnu grupu O, 17 % ima krvnu grupu B, a 7 % ima krvnu grupu AB ([www.hztm.hr](http://www.hztm.hr)).

## 1.2. Bipolarni afektivni poremećaj

Bipolarni afektivni poremećaj (BAP) složen je mentalni poremećaj kojega karakteriziraju epizode manije i depresije, a u svijetu od njega boluje oko 45 milijuna ljudi (Kerner, 2015.; [www.who.int](http://www.who.int)). Epizode manije karakteriziraju osjećaji ushićenosti, energičnosti i razdražljivosti, dok se u epizodama depresije osoba osjeća ravnodušno, tužno i beznadno. Simptomi depresije mogu prethoditi ili slijediti manične epizode, a ponekad čak i pratiti manične epizode, iako nisu potrebni za postavljanje dijagnoze. Manje ozbiljna razdoblja manije nazivaju se hipomanične epizode ([www.nimh.nih.gov](http://www.nimh.nih.gov)).

Na temelju simptoma razlikuju se 3 osnovne vrste bipolarnoga poremećaja, a sve 3 uključuju jasne promjene raspoloženja, energije i aktivnosti. BAP I karakteriziraju manične epizode koje traju najmanje 7 dana (veći dio dana, gotovo svaki dan) ili kad su manični simptomi toliko ozbiljni da je potrebna hospitalizacija. Obično se javljaju i depresivne epizode koje traju

najmanje 2 dana, a moguće su i epizode poremećaja raspoloženja s mješovitim značajkama i maničnih i depresivnih simptoma. BAP II karakteriziraju depresivne i hipomanijske epizode, bez jakih maničnih epizoda. Treća vrsta je ciklotimijski poremećaj (ciklotimija), kojeg karakteriziraju trajni hipomanijski i depresivni simptomi koji nisu dovoljno intenzivni ili ne traju dovoljno dugo da bi se mogli označiti kao hipomanijske ili depresivne epizode. Simptomi se obično pojavljuju najmanje dvije godine kod odraslih i najmanje jednu godinu kod djece i tinejdžera ([www.nimh.nih.gov](http://www.nimh.nih.gov)).

Osobe s BAP-om mogu imati i neke druge mentalne poremećaje. Često se javljaju psihotični simptomi, kao što su halucinacije i/ili zablude, koji su pronađeni kod 50 % pacijenata (Kerner, 2015.). Često se dijagnosticiraju i anksiozni poremećaj te ADHD (engl. Attention deficit hyperactivity disorder). Također, osobe s BAP-om sklone su zlouporabi droge i alkohola te povremeno mogu imati poremećaj prehrane poput pretilosti ili bulimije ([www.nimh.nih.gov](http://www.nimh.nih.gov)). Nažalost, mnogi pacijenti s bipolarnim poremećajem jedini izlaz iz svog stanja vide u suicidu (Kerner, 2015.).

Dijagnoza BAP-a postavlja se na temelju simptoma pacijenata, a uzrok bolesti još nije poznat ([www.nimh.nih.gov](http://www.nimh.nih.gov)). Smatra se da genetski čimbenici igraju značajnu ulogu u etiologiji, na što su ukazala istraživanja obitelji, blizanaca i posvojene djece (Tsuang i Faraone, 2000.). Čimbenici rizika iz okoliša, kao što su traume, infekcije i upale, imaju manji doprinos (Kerner, 2015.).

BAP se uglavnom liječi lijekovima (stabilizatori raspoloženja, atipični antipsihotici), psihoterapijom ili njihovom kombinacijom. Jedan od najčešće korištenih lijekova je litij, koji može spriječiti epizodne promjene raspoloženja ili smanjiti njihov intenzitet kad se pojave, a također smanjuje i rizik od samoubojstva ([www.nimh.nih.gov](http://www.nimh.nih.gov)).

### 1.3. Depresija

Depresija je heterogeni poremećaj, od kojega u svijetu pati oko 280 milijuna ljudi ([www.who.int](http://www.who.int)). Simptomi depresije jesu depresivno raspoloženje, gubitak interesa ili osjećaja užitka u aktivnostima, izražena promjena tjelesne težine ili apetita, poremećaj spavanja (insomnija ili hipersomnija), psihomotorna agitacija (simptom povezan sa širokim rasponom poremećaja raspoloženja) i psihomotorna retardacija (usporavanje misli i smanjenje fizičkih

pokreta), osjećaj umora ili nedostatka energije, osjećaj bezvrijednosti ili krivnje, poteškoće u koncentraciji ili neodlučnost te suicidalne misli (Beach i Whisman, 2011.).

Dijagnoza trajnoga depresivnog poremećaja (nazvan i distimija) postavlja se ako postoji prisutnost 2-4 navedenih simptoma u trajanju od najmanje dvije godine, dok se dijagnoza velikoga depresivnog poremećaja postavlja ako je u životu pojedinca prisutna jedna ili više velikih depresivnih epizoda, koje su definirane prisutnošću 5 ili više navedenih simptoma, tijekom najmanje 2 tjedna. Epizode velike depresije u prosjeku traju 16 tjedana (Beach i Whisman, 2011.).

Iako je depresivni poremećaj čest i otežava funkcioniranje, često se ne liječi, a kad se liječi, terapija često nije dovoljno učinkovita. Depresivni poremećaj kod odraslih u velikoj mjeri oslabljuje i narušava mnoge uloge u njihovom životu te predviđa depresiju i disfunkcionalno ponašanje kod potomaka. Takvo ozbiljno ili vrlo ozbiljno oštećenje uloga pronađeno je u preko 70 % osoba s depresijom. Moglo bi se reći da je depresija zapravo jedan veliki javno-zdravstveni problem koji pogađa ljude svih dobi i socijalno-ekonomskih statusa (Beach i Whisman, 2011.; Hammen, 2018.).

Postoje različiti čimbenici rizika za depresiju. Neki od njih su: stres, kognitivni čimbenici rizika, prisutnost depresije u roditelja (osobito majke) te ženski spol (Hammen, 2018.). Dokazano je da veliki stresori pokreću većinu klinički značajnih depresivnih epizoda. Depresija tada pogoršava probleme u obitelji, a s tim problemima povećava se percipirani stres i gubitak podrške, čime se održava depresivna epizoda, odnosno stvara se začarani krug depresija-stres-depresija (Beach i Whisman, 2011.; Hammen, 2018.). Dugotrajna izloženost stresu može dovesti i do složenoga stanja u organizmu koje se naziva alostatsko opterećenje. Ako takvo opterećenje potraje, znatno se povećava rizik od nastanka neke bolesti, odnosno dolazi do dugoročnih fizičkih i mentalnih posljedica za zdravlje (Hammen, 2018.; [www.hrcak.srce.hr](http://www.hrcak.srce.hr)). Pokazano je da depresivne osobe, u usporedbi s nedeprativnim osobama, povećano procesuiraju i iznose negativne informacije, da im se teško odvojiti od negativnoga te da imaju manjak kognitivne kontrole u obradi negativnih informacija. Nadalje, djeca depresivnih majki ne nasljeđuju samo genetske predispozicije za depresiju, već i čimbenike rizika povezane s depresijom, a to su: izloženost stresnim uvjetima tijekom svoga razvoja, nestabilnost braka roditelja i njihovi sukobi, maladaptivno ponašanje roditelja (npr. izbjegavanje, povlačenje, pasivna agresija), roditeljsko oblikovanje uvjerenja i svijesti djeteta kroz njihov negativan pogled na sebe, svijet i budućnost te usvajanje disfunkcionalnih vještina suočavanja sa stresom. Ženski spol je česti čimbenik rizika jer su adolescentne djevojke i odrasle žene više izložene

stresorima i nepovoljnim uvjetima od muškaraca te zbog toga imaju veću vjerojatnost pojave velikoga depresivnog poremećaja u odnosu na muškarce (omjer 2:1). Neki od primjera su to što su žene više izložene nasilju i seksualnom zlostavljanju od muškaraca, imaju manju moć upravljanja svojom sudbinom, posao nižega statusa i manje plaće, imaju manji pristup nagradama i priznanjima nego muškarci te su više opterećene kroničnim stresnim ulogama majčinstva, uz česte dvostruke uloge (majka i radnica, supruga i majka, samohrana majka) (Hammen, 2018.).

Otpribliže 60-70 % pacijenata s akutnom depresijom ima suicidalne misli te postoji visoka učestalost suicida (10-15 %) u pacijenata s depresijom. Najuspješniji pristup izbjegavanja rizika od samoubojstva je psihofarmakološki pristup antidepressivima i/ili stabilizatorima raspoloženja, uz što su važne i psihoterapijske i psihosocijalne intervencije (Moller, 2003.). Zanemarivanje prisutnih problema u braku ili obitelji pojedinca s depresijom pri liječenju, može dovesti do manje učinkovitosti liječenja i povećati rizik od recidiva. Ukoliko se liječi samo pacijenta, ta je terapija uglavnom nepotpuna, te bi se trebalo posvetiti rješavanju problema unutar obitelji ili unutar para (Beach i Whisman, 2011.).

#### 1.4. Povezanost ABO sustava krvnih grupa i različitih bolesti

Korelacije između krvnih grupa i razvoja bolesti proučavane su od ranih 1900-ih kada je utvrđeno da se protutijela i antigeni nasljeđuju. Dokazano je da je podložnost različitim bolestima poput tumora, kardiovaskularnih bolesti, infekcija, hematoloških poremećaja, kognitivnih poremećaja, bolesti krvotoka, metaboličkih bolesti i malarije povezana s ABO krvnim grupama. Međutim, do danas nije dokazan točan mehanizam kojim ABO krvne grupe mogu utjecati na rizik razvoja određenih bolesti (Abegaz, 2021.).

##### 1.4.1. ABO sustav krvnih grupa i zarazne bolesti

Springer je uočio da mnogi gram-negativni organizmi (npr. *Escherichia coli*) imaju na svojoj membrani kemijsku strukturu koja nalikuje A i B antigenima. Smatra se da anti-A i anti-B protutijela ne nastaju prvenstveno kao protutijela protiv A i B antigena na površini eritrocita, već da nastaju kao odgovor na susret s bakterijama koje imaju sličan obrazac A i B antigena i

da tako nastala protutijela pokazuju križnu reaktivnost s A i B antigenima na površini eritrocita (Garraty, 2005.).

Provedena su različita istraživanja koja povezuju ABO sustav sa zaraznim bolestima. Pokazano je da je krvna grupa O povezana s povećanom učestalošću kolere, kuge, tuberkuloze i infekcije zaušnjacima te da je krvna grupa A povezana s povećanom učestalošću malih boginja i infekcije *Pseudomonas aeruginosa*. Nasuprot tomu, krvna grupa B povezana je s većom učestalošću gonoreje, tuberkuloze, salmonela i infekcija *Streptococcus pneumoniae* i *E. coli*, a krvna grupa AB pokazuje povećanu učestalost infekcija malih boginja i *E. coli* te salmonela (Abegaz, 2021.). Smatra se da su zapravo velike razlike u raspodjeli ABO krvnih grupa u različitim dijelovima svijeta posljedice epidemija koje su se dogodile u prošlosti (Garraty, 2005.). Ono što bi se još moglo povezati s tim je činjenica da je pronađena veća učestalost O fenotipa krvne grupe u području gdje je malarija endemska. Mogući uzrok tome je što O krvna grupa pruža selektivnu zaštitu protiv teške malarije, jer kod osoba s krvnom grupom O nastaje manje formiranih rozeta koje adheriraju na vaskularni endotel i uzrokuju suženje žila i tešku bolest (Liumbruno i Franchini, 2013.).

Peptički ulkus također je povezan s ABO krvnim grupama i to na način da su osobe krvne grupe O podložnije bolesti. Gastritis i ulceracija želuca povezani su s infekcijom *Helicobacter pylori* te se smatra da je vezanje *H. pylori* za sluznicu želuca čovjeka posredovano fukoziliranim antigenima tipa H 1 i Lewis b ( $Le^b$ ). Topljivi glikoproteini koji prezentiraju  $Le^b$  ili protutijela na  $Le^b$  antigen mogu inhibirati bakterijsko vezanje. Nadalje, smatra se da pretvorba  $Le^b$  u  $ALe^b$  dodatkom terminalnoga GalNAc oslabljuje mogućnost bakterijskoga vezanja. To može objasniti smanjenu infektivnost *H. pylori* za nositelje krvnih grupa AB/B/A u usporedbi s nositeljima krvne grupe O (Abegaz, 2021.).

#### 1.4.2. ABO sustav krvnih grupa i kardiovaskularne bolesti

ABO sustav krvnih grupa povezan je i s mnogim oblicima kardiovaskularnih bolesti (KVB), uključujući koronarnu bolest srca, moždani udar i vensku tromboemboliju (VT). Općenito, pokazano je da osobe s krvnom grupom O imaju smanjeni rizik od KVB-a (Alexander i sur., 2014.)

Dokazano je da osobe koje imaju ne-O krvnu grupu imaju za oko 25 % veću razinu von Willebrandovog faktora (vWF) (Liumbruno i Franchini, 2013.). Budući da je koagulacijski

čimbenik VIII (FVIII) stabilan u krvi samo kad je vezan na vWF, koncentracije vWF-a u plazmi određuju koncentraciju FVIII u plazmi. Stoga osobe s ne-O fenotipom imaju i povećanu razinu FVIII te su sklonije zgrušavanju krvi (Yamamoto, 2021.). A, B i H antigeni, koji su eksprimirani na N-vezanim glikanima vWF-a utječu na poluvrijeme života vWF-a [ $t_{1/2}$  (O-fenotip):10h;  $t_{1/2}$ (ne-O fenotip): 25h] te se smatra da je to razlog povećane razine vWF-a u plazmi kod osoba nositelja ne-O krvne grupe. (Anstee, 2010.).

Nezavisno o vWF i FVIII, neki drugi čimbenici koji pokazuju ovisnost o ABO sustavu također mogu biti uključeni u osjetljivost na kardiovaskularne bolesti, kao što su: topljiva međustanična adhezijska molekula-1 (sICAM-1), topljivi E-selektin, topljivi P-selektin i faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Zhang i sur., 2012.; Liumbruno i Franchini, 2016.; Yamamoto, 2021.).

Neka su istraživanja ukazala na postojanje veće razine ukupnoga kolesterola i kolesterola niske gustoće (LDL kolesterola) kod osoba nositelja A fenotipa krvne grupe, u usporedbi s osobama nositelja krvne grupe O i B, što sugerira da bi osobe krvne grupe A mogle imati povećani rizik od hiperlipidemije (Groot., 2020.).

#### 1.4.3. ABO sustav krvnih grupa i maligne bolesti

Postoji mnogo izvješća o povezanosti ABO krvnih grupa sa zloćudnim tumorima. Istraživanja prije 1950. nisu baš pouzdana zbog premaloga broja sudionika i dizajna studija te zbog nedostatka svijesti o širokoj raznolikosti raspodjele frekvencija ABO fenotipa (Limbruno i Franchini, 2013.). Većina znanstvenika prvim pouzdanim izvještajem smatra studiju Aird-a i Bentall-a koji su 1953. pokazali da je 20 % više osoba s krvnom grupom A imalo rak želuca u usporedbi s krvnom grupom O. To je bila velika studija, čiji rezultati su potvrđeni u više od 100 kasnijih studija u različitim dijelovima svijeta (Garatty, 2005.).

Jedan od predloženih mehanizama povezanosti ABO sustava s tumorima je povezan s činjenicom da maligne stanice teže gubitku normalnih antigena i stječu nove, tzv. tumorske antigene. U skladu s tom teorijom pokazano je da se ABH antigeni smanjuju na malignim stanicama kako malignost napreduje te da je gubitak A, B i H antigena proporcionalan metastatskom potencijalu tumora. Isto tako, pokazano je da neki tumori pokazuju A ili „A-slična“ antigenska svojstva. Takvi A ili „A-slični“ antigeni mogu se detektirati na tumorima pacijenata koji nisu krvne grupe A i tada ih imunski sustav može prepoznati zbog prisutnosti anti-A protutijela u serumu. Zbog nedostatka anti-A protutijela u serumu, imunski sustav u

osoba krvne grupe A neće prepoznati takve „A-slične“ tumorske antigene, kao što bi ih, na primjer, prepoznao u osoba s krvnom grupom O (Garatty, 2005.).

#### 1.4.4. ABO sustav krvnih grupa i afektivni poremećaji

Od 1970-tih. do 2002. provedeno je više manjih istraživanja o povezanosti ABO sustava krvnih grupa i BAP-a i depresije. Rezultati istraživanja nisu bili konzistentni.

Rinies je 1979. proučavao uzorak od 190 grčkih pacijenata s afektivnim poremećajem, koje je podijelio u 3 skupine (BAP, unipolarni poremećaj, involucijska depresija). Pronašao je veću učestalost krvne grupe O ( $\chi^2=8,61$ ,  $df=1$ ,  $P<0,01$ ) i manju učestalost krvne grupe A ( $\chi^2=6,83$ ,  $df=1$ ,  $p<0,01$ ) kod pacijenata s BAP-om u usporedbi s kontrolnom skupinom. Također je utvrdio i značajno veću pojavnost krvne grupe O kod pacijenata s unipolarnim afektivnim poremećajem ( $\chi^2=7,62$ ,  $df=1$ ,  $p<0,05$ ) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Pacijenti s BAP-om i unipolarnim poremećajem, odnosno depresijom, nisu se međusobno razlikovali u raspodjeli krvnih grupa (Rinieris, 1979.). Nasuprot tome, Shapiro je Fisherovim egzaktnim testom dokazao značajnu razliku u učestalosti A i O krvnih grupa između danskih pacijenata s BAP-om i unipolarnom depresijom (za krvnu grupu O:  $p=0,0004$ .; a za krvnu grupu A:  $p=0,002$ ). Pacijenti s bipolarnom depresijom su imali veću pojavnost krvne grupe O, a pacijenti s unipolarnom depresijom veću pojavnost krvne grupe A. Nije utvrdio statistički značajnu razliku u raspodjeli ABO fenotipova između svih pacijenata i kontrolne skupine ( $\chi^2=3,91$ ,  $df=3$ ,  $p=0,27$ ), a analizirao je skupinu od 66 pacijenata, od kojih je 43 imalo bipolarnu depresiju, a 23 unipolarnu depresiju (Shapiro i sur., 1977.). Takawaza je 1988. ispitivao uzorak od 118 japanskih pacijenata s afektivnim poremećajima koje je klasificirao u 3 vrste prema DSM-III klasifikaciji: velika depresija, tj. unipolarni poremećaj (81 pacijent), BAP (31 pacijent) te ostali specifični afektivni i atipični afektivni poremećaji (6 pacijenata). Kontrolnu skupinu činilo je 212 zdravih Japanaca. Kao i Rinieris, nije pronašao statistički značajnu razliku u raspodjeli ABO krvnih grupa između pacijenata s depresijom i BAP-om. Međutim, za razliku od drugih studija pronašao je veću učestalost krvne grupe B ( $p<0,05$ ) kod svih pacijenata s afektivnim poremećajima u usporedbi s kontrolnom skupinom (Takawaza, 1988.). Razlike u dokazivanju povezanosti afektivnih poremećaja s ABO krvnom grupom moguće je pripisati i populacijskim razlikama u razdiobi ABO krvnih grupa.

Rihmer i Arato te Zonda i Lester analizirali su odnos samo između BAP-a i ABO krvnih grupa. Rihmer i Arato su usporedili distribuciju ABO krvnih grupa 246 manično-depresivnih pacijenata sa 6000 kontrolnih ispitanika, a Zonda i Lester su napravili istraživanje na 100 pacijenata s BAP-om. U oba istraživanja na mađarskim psihijatrijskim bolesnicima je pronađena statistički značajna razlika u učestalosti ABO krvnih grupa između pacijenata s BAP-om I i pacijenata s BAP-om II. Međutim, u Rihmerovom istraživanju pronađena je razlika u učestalosti krvne grupe A svih pacijenata s BAP-om u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $\chi^2=4,89$ ,  $df=1$ ,  $p<0,05$ ), a u istraživanju Zonde i Lestera nije dokazana statistički značajna razlika u raspodjeli ABO krvnih grupa između pacijenata s BAP-om i opće populacije ( $\chi^2=4,61$ ,  $df=3$ ,  $p>0,10$ ) (Rihmer i Arato, 1981.; Zonda i Lester, 2002.).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

ABO sustav najvažniji je sustav krvnih grupa u transfuzijskoj i transplantacijskoj medicini, jer predstavlja imunsku prepreku pri transfuziji krvi i transplantaciji stanica, tkiva ili organa. ABO nekompatibilna transfuzija krvi može uzrokovati aglutinaciju i lizu eritrocita, zatajenje bubrega i ponekad smrt primatelja krvi, a transplantacija nekompatibilnih organa može dovesti do akutnoga odbacivanja presatka. Također, poznato je da ABO nekompatibilna trudnoća, između majke krvne grupe O i fetusa krvne grupe ne-O (A, B ili AB), može dovesti do hemolitičke bolesti novorođenčeta, iako je ta reakcija u vrlo rijetkim slučajevima simptomatska te većinom ne zahtijeva liječenje (Garraty, 2005.; Vuk Pisk i sur., 2018; Yamamoto, 2021.). Međutim, sve više se ispituje funkcija A i B antigena u fiziološkim i patološkim stanjima ljudskoga organizma. U zadnjih nekoliko desetljeća povezuju se ABO polimorfizmi s patogeneom pojedinih bolesti i pokušavaju se utvrditi molekularni mehanizmi koji su uzrok tih povezanosti. Provode se genomske studije povezanosti (engl. *genome wide association studies*, GWAS) na različitim populacijama, kohortna istraživanja te razne meta-analize postojećih istraživanja. Od otkrića ABO utvrđeno je da su mnoge bolesti povezane s ABO polimorfizmima, poput venske tromboembolija, raka gušterače, cerebralne malarije i koronarne bolesti (Yamamoto, 2021.). Naime, otkrivanje ABO polimorfizama kao čimbenika rizika za razvoj neke bolesti, može pridonijeti razvoju preventivskih mjera i novih metoda liječenja te bolesti.

Afektivni poremećaji su skup psihijatrijskih poremećaja, koji se nazivaju i poremećaji raspoloženja. Dvije glavne vrste afektivnih poremećaja su depresija i BAP ([www.healthine.com](http://www.healthine.com)). Do sada ne postoji puno istraživanja, a osobito novijih, koja su analizirala povezanost između ABO sustava krvnih grupa i afektivnih poremećaja. Postojeća istraživanja su ispitivala povezanost na razini 4 ABO fenotipa krvnih grupa te su dobiveni rezultati kontradiktorni. Stoga je cilj ovog rada ispitati istraživanjem parova korelaciju između ABO sustava krvnih grupa, na razini ABO genotipova, i pojavnosti BAP-a i depresije u populaciji Hrvatske, na uzorku od 96 pacijenata s dijagnozom BAP-a ili depresije.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Ispitanici

Skupina bolesnica sastoji se od 96 pacijentica, u dobi između 19 i 75 godina, s dijagnozom BAP-a (39 bolesnica) ili depresije (57 bolesnica). Dijagnoze koje su postavljene pacijenticama prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz dijagnoza ispitanica

Dijagnoza	%
povratni depresivni poremećaj, sadašnja epizoda teška, bez psihotičnih simptoma	36,5
teška depresivna epizoda bez psihotičnih simptoma	13,6
bipolarni afektivni poremećaj, sadašnja epizoda manična sa psihotičnim simptomima	13,6
bipolarni afektivni poremećaj, sadašnja epizoda miješana	9,4
bipolarni afektivni poremećaj, sadašnja epizoda teška depresija bez psihotičnih simptoma	8,3
povratni depresivni poremećaj, sadašnja epizoda teška, sa psihotičnim simptomima	7,3
bipolarni afektivni poremećaj, sadašnja epizoda manična bez psihotičnih simptoma	4,2
bipolarni afektivni poremećaj, sadašnja epizoda teška depresija sa psihotičnim simptomima	3,1
bipolarni afektivni poremećaj, sadašnja epizoda hipomanična	1,0
bipolarni afektivni poremećaj	1,0
teška depresivna epizoda sa psihotičnim simptomima	1,0
povratni depresivni poremećaj, sadašnja epizoda srednje teška	1,0

68,8 % pacijentica ima relaps bolesti, 17,7 % je na prvom liječenju, a 13,5 % je u remisiji bolesti. Prema Hamiltonovoj ljestvici, 46,9 % ispitanica ima tešku depresiju. Do sad je 30 njih pokušalo suicid (31,1 %), kod njih 27 (28,1 %) je suicidalnost aktualna te 21,9 % njih ima visok rizik na ljestvici „Columbia suicidality score“. Somatski komorbiditeti su prisutni kod 38,5 % ispitivane skupine. Bračni status ispitanica jest sljedeći: 50,0 % pacijentica je udano,

30,2 % nije u vezi, 10,4 % je udovica, a 9,4 % je razvedeno. Najviše u ispitivanoj skupini, 69,8 %, je srednje stručne spreme, 21,9 % je visoke stručne spreme, a 8,3 % je niske stručne spreme. Nezaposleno je 26 pacijentica (27,1 %), u mirovini je 21 (21,9 %), 5 pacijentica (5,2 %) je na studiju, 2 su učenice (2,1 %), a ostalih 43,7 % je u radnom odnosu. Uzorkovanje krvi bolesnica provedeno je u Klinici za psihijatriju „Sveti Ivan“.

Kontrolna skupina preuzeta je iz rada Vuk Pisk *ABO blood group and psychiatric disorders: a Croatian study* (Vuk Pisk i sur., 2018.), a radi toga što skupinu ispitanica čine osobe ženskoga spola, iz kontrolne skupine izuzeti su muškarci. Sastoji se od 123 dobrovoljne, zdrave darivateljice krvi, u dobi od 18 do 76 godina.

### 3.1.2. Uređaji, pribor i kemikalije

Genomska DNA iz uzoraka pacijenata izolirana je iz uzoraka pune krvi uzete na EDTA antikoagulans na uređaju za automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina QIAcube u Odjelu za molekularnu dijagnostiku (OMD) Hrvatskoga zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM).

Za izolaciju su korišteni:

- QIAcube uređaj
- QIAamp DNA Blood Mini QIAcube Kit (lizirajući pufer AL, apsolutni etanol, pufer za ispiranje AW 1, pufer za ispiranje AW 2, pufer za eluciju AE, proteaza, kolona sa silika-gel membranom za izolaciju)
- plastični adapteri koji služe za centrifugiranje kolona sa silika-gel membranom i epruveta za eluciju
- gumeni čepovi koji označavaju poziciju i broj uzoraka na inkubatoru s miješalicom
- apsolutni etanol
- nastavci s filterom od 1000 µL, 100 µL
- pipeta do 1000 µL
- pipeta do 100 µL
- računalo hztn-Delphyn OMD 02

Nakon izolacije genomske DNA, provela se ABO genotipizacija. Za alel-specifičnu lančanu

reakciju polimeraze (PCR-SSP) korišteni su:

- genomska DNA kao kalup
- početnice za PCR-SSP od 8 reakcija i početnice za pozitivnu internu kontrole (HGH-  
humani hormon 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'

- bidestilirana voda
- epruvete od 1,5 mL
- 10X pufer za amplifikaciju uz 1,5 M MgCl<sub>2</sub>
- 10 mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Taq DNA polimeraza (5 U/μL) (Applied Biosystems, SAD)
- pipete od 10, 100 i 1000 μL
- nastavci za pipete s filterom od 10, 100 i 1000 μL
- epruvete za PCR u stripu po 8
- PCR uređaj (Thermal cycler 9700, 2720 (Thermo Fisher Scientific, SAD)

Nakon umnožavanja PCR produkti podvrgnuti su elektroforezi, a korišteni su:

- PCR CheckIT Wide Mini 4x25 s etidijevim bromidom (AL-Labortechnik, Austrija)  
gotovi pripremljeni gelovi Clearose
- 1XTAE pufer

- Etidijev bromid, 10 mg/mL
- kada za elektroforezu (Origins by Elchrom Scientific, Švicarska)
- ispravljač struje
- pipete od 10 i 20  $\mu$ L i nastavci
- pufer za nanošenje uzorka
- molekularni biljeg od 100 pb (parova baza)
- menzura

Na kraju su gelovi snimljeni kamerom. Korišteni su:

- kamera UVISAVE-Q9 HOD, Uvitec (Cambridge, UK)
- računalo sa UVITEC 1D Software
- UV transiluminator valne duljine 254-312nm
- Sjenilo kamere
- plastični okvir za gel
- pisač
- rukavice
- papirnati ubrusi

## 3.2. Metode

### 3.3.1. Izolacija genomske DNA

Izolacija genomske DNA iz EDTA uzoraka rađena je na QIAcube uređaju za automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina, prema radnoj uputi odjela OMD, RU-OMD-033.

Na QIAcube uređaju moguće je izolirati najmanje dva, a najviše 12 uzoraka u isto vrijeme. Izolacija se provodi standardnim QIAGEN kitovima za izolaciju nukleinskih kiselina na kolonama sa silika-gel membranom. U pufere za ispiranje AW1 i AW2, koji se nalaze u QIAGEN kitu, potrebno je dodati apsolutni etanol prije uporabe. Također je prije izolacije DNA potrebno pripremiti radnu otopinu proteaze na način da se u bočicu s liofiziliziranom proteazom doda proteazno otapalo prema uputi na etiketi bočice. Otopljeni sadržaj se promiješa, alikvotira i pohrani na +4 °C.

Izolacija se provodi na način da se uređaj uključi i pričeka 30-tak sekundi da se provede inicijalizacijski test. Zatim se uređaj otvori i postavi nosač s reagensima (lizirajući pufer, puferi za ispiranje, apsolutni etanol, pufer za eluciju). Nakon toga se nosači s nastavcima s filterom napune. Na poziciju A umetne se QIAGEN proteaza u epruveti od 1,5 ml te se na stalku pripreme adapteri tako da se kolona sa silika-gel membranom umetne na poziciju L1, a epruveta za eluciju na poziciju L3. Tako pripremljeni adapteri umetnu se u centrifugu. 200  $\mu$ L pune krvi otpipetira se u epruvete od 2,0 ml i stavi ih se u inkubator s miješalicom skupa s gumenim čepovima koji označavaju poziciju uzoraka i njihov broj. Slijedi pokretanje programa na uređaju. Izolirana genomska DNA je visoke čistoće i prinosa.

### 3.2.2. ABO genotipizacija

ABO genotipizacija provedena je *in house* metodom PCR-SSP-a, prema radu Gassner i sur, 1996 i radnoj uputi OMD odjela, RU-OMD-009. Ovom metodom mogu se razlikovati homozigotni i heterozigotni nositelji 5 glavnih alela gena enzima ABO glikozil transferaze: A1, A2, B, O1 i O2.

Prije ABO genotipizacije, potrebno je pripremiti 8 mješavina početnica. Pripremaju se tako da se u epruvetu od 1,5 mL otpipetira 100  $\mu$ L specifične početnice 5' kraja, 100  $\mu$ L specifične početnice 3' kraja, 10  $\mu$ L HGH te 780  $\mu$ L bidestilirane vode. Pripremljena smjesa dovoljna je za 200 uzoraka, a po završetku pripreme podijeli se u alikvote i zamrzne.

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je metoda koja ima veliki potencijal umnožavanja DNA, do  $10^9$  puta (Čvorišćec i Čepelak, 2009.). U ovom radu provedena je se na sljedeći način: prvo se alikvoti mješavina početnica otope na sobnoj temperaturi. Nakon toga, u PCR stripove (kojih ima po 8 u jednom redu) otpipetira se redom po 10  $\mu$ L reakcijske smjese jedne specifične početnice. Za svaki uzorak koristi se svih 8 reakcijskih smjesa s određenom početnicom, odnosno jedan red označava jedan uzorak. U jednom danu bilo je moguće analizirati ukupno 12 uzoraka. Nakon što se u PCR strip otpipetiraju mješavine početnica, pripremi se PCR mješavina koja za 1 uzorak sadrži: 20  $\mu$ L 10x PCR pufera s 15mM  $MgCl_2$ , 8  $\mu$ L 10 mM dNTP-a, 2  $\mu$ L Taq DNA polimeraze (aktivnosti 5 U/ $\mu$ L), 60  $\mu$ L bidestilirane vode i 10  $\mu$ L DNA. Kada se pripremi PCR reakcijska smjesa, u svaku epruveticu, u kojoj je prethodno otpipetirano 10  $\mu$ L reakcijske smjese određene početnice, doda se 10  $\mu$ L pripremljene reakcijske smjese za

PCR. Začepljene epruvetice potom idu u PCR uređaj. U PCR uređaju se odabere program za umnožavanje (Tablica 3.)

Tablica 3. Program rada PCR uređaja za ABO genotipizaciju

95° C	2 min	} 10 ciklusa
95 °C	30 sek	
64 °C	1 min	
72 °C	45 sek	
95 °C	30 sek	} 25 ciklusa
61 °C	1 min	
72 °C	45 sek	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

Dobiveni PCR-SSP produkti provjereni su elektroforezom na gelu od 1,5 % Clearose u 1xTAE puferu, prema radnoj uputi RU-OMD-011-Elektroforeza.

PCR-om umnoženi dijelovi-ulomci DNA razdvajaju se elektroforezom na način da putuju različitom brzinom kroz pore gela pod utjecajem istosmjerne struje. Brzina kretanja nukleinskih kiselina kroz gel ovisi prvenstveno o veličini molekule, a potom o obliku i konformaciji (RU-OMD-11; Čvorišćec i Čepelak, 2009.).

Uzorci za elektroforezu pripremaju su se tako da se 8µL PCR produkta pomiješa s 2 µL pufera za nanošenje uzoraka (engl. *loading buffer*) koji se sastoji od bromfenol plavila i glicerola. Nužno je u jednu od jažica na gelu staviti 5 µL molekularnoga biljega od 100 pb, kako bi se mogla odrediti veličina umnoženih PCR-SSP produkata. Kada se uzorci nanesu u jažice gela, kadica se poklopi i priključi na izvor istosmjerne struje. Uvjeti elektroforeze su: 120 V/43 mA, tijekom 15min. Elektroforeza se odvija u smjeru od katode prema anodi, jer su umnoženi DNA produkti negativno nabijeni.

Nakon završene elektroforeze, gel se obasja UV svjetlošću (UV transiluminator) i PCR produkti se fotografiraju digitalnom UVISAVE-Q9 HOD UVITEC kamerom, prema RU-OMD-012-Snimanje gelova. Dobivene snimke produkata u gelu ulažu se u registrator, te u mapu u programu kamere UVITec1D.

### 3.2.2.1. Interpretacija rezultata

PCR-SSP reakcijom može se umnožiti ukupno 8 različitih PCR produkata veličina prema tablici 4. U svakoj od reakcija trebao je biti umnožen ulomak gena *HGH* duljine 434 pb, kao pozitivna interna PCR kontrola.

Od mogućih 8 umnoženih produkata, njih 4 (1, 3, 5 i 7) označava pozitivnu reakciju specifičnu za alel, a ostalih 4 ukazuje na odsutnost određenog alela. Tako je, na primjer, umnoženi produkt na poziciji 1 karakterističan za O1 alel, dok umnoženi produkt na poziciji 2 ukazuje na odsutnost O1 alela. (Gasnner i sur., 1996.). Rezultati PCR-SSP ABO genotipizacije očitani su pomoću tablice 4.

Tablica 4. Tablica za očitovanje ABO genotipa iz elferograma

Broj SSP reakcije	1	2	3	4	5	6	7	8	ABO	
PCR produkt (pb)	134	133	134	194	195	194	172	173		
REZULTATI									genotip	fenotip
Pozicija 1- poz. (O1)	+	-	-	+	-	+	-	+	O1O1	O
	+	+	+	+	-	+	-	+	O1O2	O
	+	+	-	+	+	+	-	+	O1B	B
	+	+	-	+	-	+	-	+	O1A1	A
	+	+	-	+	-	+	+	+	O1A2	A
Pozicija 3- poz. (O2)	-	+	+	-	-	+	-	+	O2O2	O
	-	+	+	-	+	+	-	+	O2B	B
	-	+	+	+	-	+	-	+	O2A1	A
	-	+	+	+	-	+	+	+	O2A2	A
Pozicija 5- poz. (B)	-	+	-	+	+	-	-	+	BB	B
	-	+	-	+	+	+	-	+	A1B	AB
	-	+	-	+	+	+	+	+	A2B	AB
Pozicija 2/4/6 poz. (ne O1/O2/B)	-	+	-	+	-	+	-	+	A1A1	A
	-	+	-	+	-	+	+	+	A1A2	A
	-	+	-	+	-	+	+	-	A2A2	A



### 3.2.3. Statistička obrada podataka

Statistička analiza rezultata ABO genotipizacije istraživanjem parova, tj. skupine oboljelih i kontrolne skupine provedena je uz pomoć statističkih programa Social Science Statistic i MedCalc (verzije 20.011) te programskog jezika R (verzije 4.0.5).

Usporedba dobi ispitivane i kontrolne skupine provedena je metodama deskriptivne statistike u programu Social Science Statistics. Kolmogorov-Smirnovljevi test korišten je kako bi se ispitalo jesu li podatci o dobi bolesnica i kontrolne skupine razdijeljeni po normalnoj razdiobi. Izračunate su mjera centralne tendencije (aritmetička sredina) i mjere rasipanja (varijanca, standardna devijacija i koeficijent varijance). Programom MedCalc napravljen je Welchov t-test kojim se ispituju razlike u aritmetičkoj sredini dvaju uzoraka koji nemaju jednake varijance. Tim testom ispitano je je li razlika aritmetičke sredine dobi bolesnica i kontrolne skupine statistički značajna.

Uspoređivanje ABO fenotipova i alela provedeno je hi kvadrat ( $\chi^2$ ) testom u programu MedCalc. Njime je ispitano postoji li statistički značajna razlika u zastupljenosti ABO fenotipa i alela između skupine bolesnica i kontrolne skupine. Podatci o ABO fenotipima i alelima zadovoljili su preduvjete  $\chi^2$  testa koji kažu da ispitanici moraju biti međusobno nezavisni i da očekivane frekvencije trebaju biti veće od 5 u 80 % frekvencijskih ćelija i veće od 1 u svim frekvencijskim ćelijama.

Kod usporedbe ABO genotipova između bolesnica i kontrolne skupine te kod usporedbe ABO fenotipova unutar ispitivane skupine (između pacijentica s BAP-om i depresijom) podatci nisu zadovoljili preduvjete  $\chi^2$  testa. Umjesto  $\chi^2$  testa korišten je Fisherov egzaktni test koji je napravljen programski jezikom R.

Kod svih provedenih testova, razina statističke značajnosti postavljena je na 0,05, odnosno p vrijednost manja od 0,05 ukazuje na statistički značajnu razliku.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4. 1. Rezultati

#### 4.1.1. Usporedba skupine bolesnica i kontrolne skupine po dobi

ABO genotipizacijom određeni su genotipovi skupini bolesnica i kontrolnoj skupini. Skupinu ispitanica čini 96 pacijentica koje su oboljele od bipolarnog afektivnog poremećaja ili depresije, a kontrolnu skupinu čine 123 zdrave, dobrovoljne darivateljice krvi.

Kolmogorov-Smirnovljevim testom utvrđeno je da su podatci o dobi skupine bolesnica razdijeljeni po normalnoj razdiobi ( $p=0,723$ ). Istim testom dobiveno je da su i podatci o dobi kontrolne skupine razdijeljeni po normalnoj razdiobi ( $p=0,116$ ).

Aritmetička sredina dobi skupine bolesnica iznosi 46,2 uz standardnu devijaciju (SD) 15,5, a aritmetička sredina dobi kontrolne skupine iznosi 38,2 uz SD 11,9 (Tablica 5.)

*Tablica 5. Statistička analiza skupine bolesnica i kontrolne skupine prema dobi*

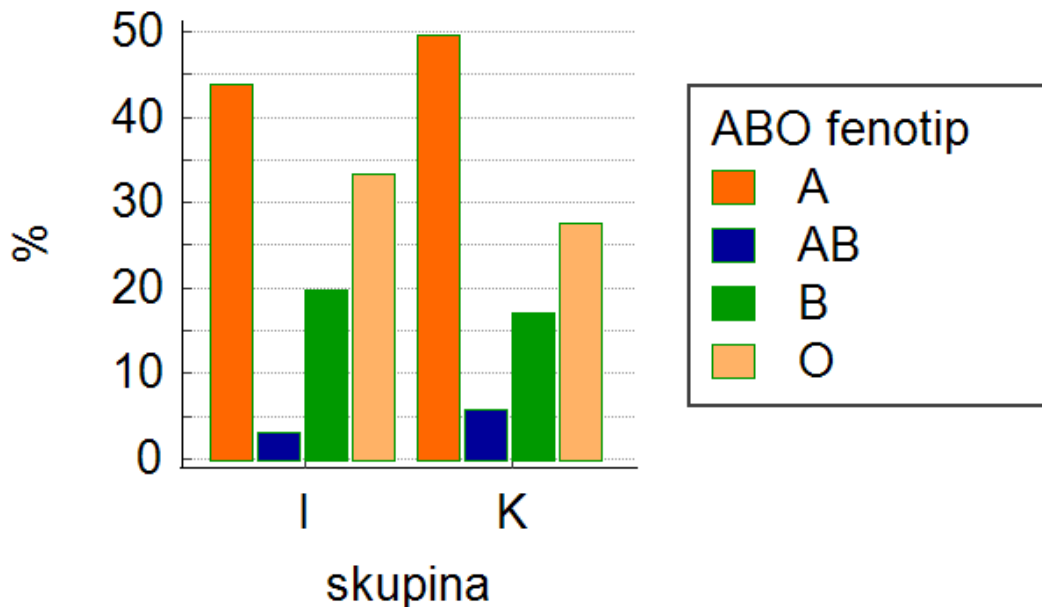
Varijable	Starosna dob ispitivane skupine (god)	Starosna dob kontrolne skupine (god)
Aritmetička sredina	46,2	38,2
Varijanca	240,5	141,2
Standardna devijacija (SD)	15,5	11,9
Koeficijent varijacije (CV)	33,5	31,1

Skupina bolesnica je nešto starija od kontrolne skupine. Welchovim t-testom dokazano je da je ta razlika statistički značajna ( $p<0.001$ ).

#### 4.1.2. Statistička analiza usporedbe ABO fenotipova između skupine bolesnica i kontrolne skupine

Krvna grupa A najzastupljenija je u obje skupine (skupina bolesnica: 43,75 %; kontrolna skupina: 49,59 %), slijedi krvna grupa O (skupina bolesnica 33,33 %; kontrolna skupina 27,64

%), zatim krvna grupa B (skupina bolesnica: 19,79 %; kontrolna skupina: 17,07 %) te najmanje zastupljena krvna grupa AB (skupina bolesnica: 3,13 %; kontrolna skupina: 5,69 %). Usporedba raspodjele krvnih grupa između skupina prikazana je slikom 2.



Slika 2. Usporedba relativnih frekvencija ABO fenotipova u skupini bolesnica i kontrolnoj skupini. K-kontrolna skupina, I-skupina bolesnica

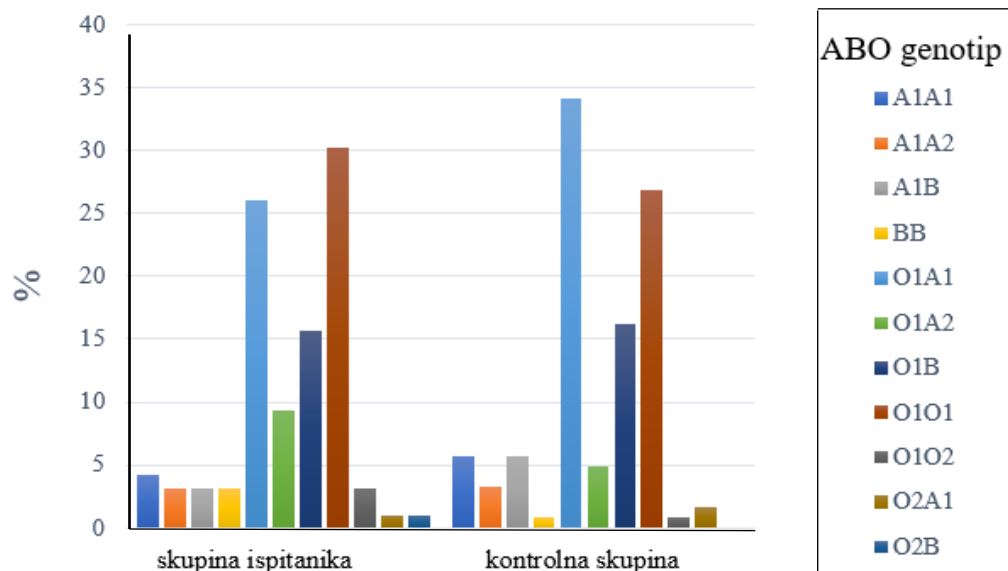
$\chi^2$  testom nije dokazana statistički značajna razlika u zastupljenosti ABO fenotipova između skupine bolesnica i kontrolne skupine ( $\chi^2=1,967$ ,  $df=3$ ,  $p=0,579$ ). Kao razina statistički značajne razlike koristila se p vrijednost manja od 0,05. Apsolutne frekvencije ABO fenotipova koje su korištene za izračun  $\chi^2$  testa prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Prikaz apsolutnih frekvencija ABO fenotipova u skupini bolesnica i kontrolnoj skupini

ABO fenotip	Skupina bolesnica (n)	Kontrolna skupina (n)	Ukupno (n)
A	42	61	103
AB	3	7	10
B	19	21	40
O	32	34	66
Ukupno (n)	96	123	219

#### 4.1.3. Statistička analiza usporedbe ABO genotipova između skupine bolesnica i kontrolne skupine

U skupini bolesnica najzastupljeniji je O1O1 genotip (30,21 %), dok je u kontrolnoj skupini najzastupljeniji O1A1 genotip (34,15 %). U skupini bolesnica slijedeći po zastupljenosti je O1A1 genotip (26,04 %), a u kontrolnoj skupini O1O1 genotip (26,83 %). Nadalje po redu genotipovi u skupini bolesnica su O1B (15,63 %), O1A2 (9,38 %), A1A1(4,17 %), A1A2 (3,13 %), A1B (3,13 %) i BB (3,13 %), O1O2 (3,13 %), O2A1 (1,04 %), O2B (1,04 %), a u kontrolnoj skupini O1B (16,26 %), A1A1 (5,69 %), A1B (5,69 %), O1A2 (4,88 %), A1A2 (3,25 %), O2A1 (1,63 %), BB (0,81 %) i O1O2 (0,81 %). O2B genotip nije pronađen u kontrolnoj skupini, dok A2A2, A2B, O2A2 i O2O2 genotipovi nisu pronađeni niti u skupini bolesnica, niti u kontrolnoj skupini (slika 3).



Slika 3. Usporedba relativnih frekvencija ABO genotipova u skupini bolesnica i kontrolnoj skupini

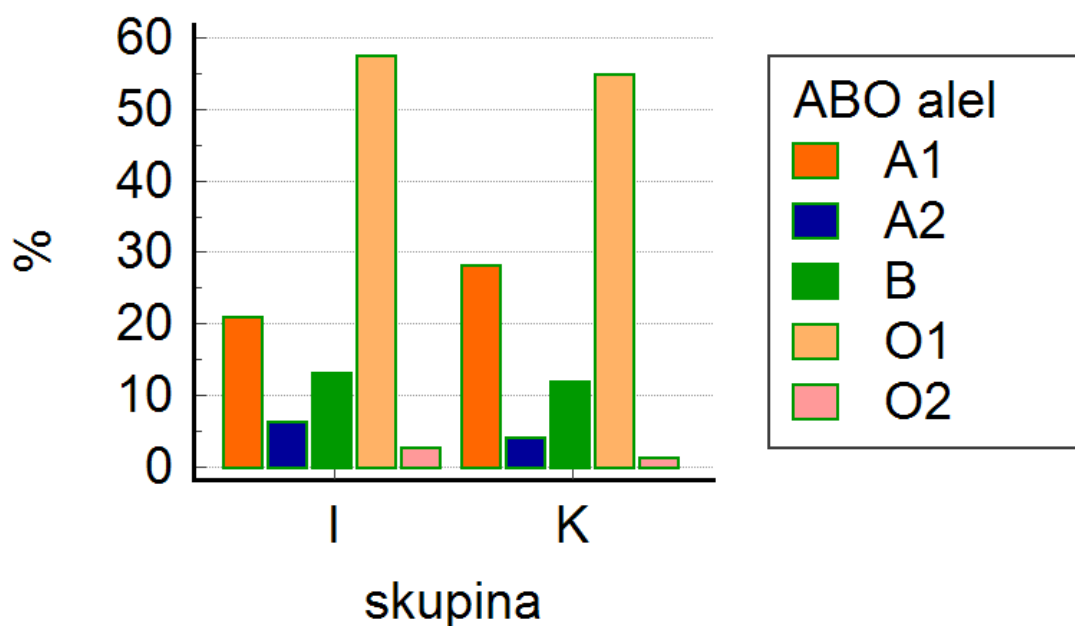
Fisherovim egzaktnim testom nije dokazana statistički značajna razlika u zastupljenosti ABO genotipova između bolesnica i kontrolne skupine. Dobivena p vrijednost iznosi 0,599. Apsolutne frekvencije genotipova prikazane su u tablici 7.

Tablica 7. Prikaz apsolutnih frekvencija ABO genotipova u skupini bolesnica i kontrolnoj skupini

ABO GENOTIP	Skupina bolesnica (n)	Kontrolna skupina (n)	Ukupno (n)
A1A1	4	7	11
A1A2	3	4	7
A1B	3	7	10
BB	3	1	4
O1A1	25	42	67
O1A2	9	6	15
O1B	15	20	35
O1O1	29	33	62
O1O2	3	1	4
O2A1	1	2	3
O2B	1	0	1
Ukupno (n)	96	123	219

#### 4.1.4. Statistička analiza usporedbe A1, A2, B, O1 i O2 alela između skupine bolesnica i kontrolne skupine

Najzastupljeniji alel u obje skupine je O1 (skupina bolesnica 57,29 %; kontrolna skupina 54,88 %). Slijedi A1 alel (skupina bolesnica 20,83 %; kontrolna skupina 28,05 %), alel B (skupina bolesnica 13,02 %; kontrolna skupina 11,79 %), alel A2 (skupina bolesnica 6,25 %; kontrolna skupina 4,07 %) te na kraju alel O2 (skupina bolesnica 2,60 %; kontrolna skupina 1,22 %) (Slika 4).



Slika 4. Usporedba relativnih frekvencija ABO alela u skupini bolesnica i kontrolnoj skupini. K- kontrolna skupina, I-skupina bolesnica

$\chi^2$  testom nije dokazano da postoji statistički značajna razlika u zastupljenosti alela između skupine bolesnica i kontrolne skupine ( $\chi^2=4,658$ ,  $df=4$ ,  $p=0,323$ ). Apsolutne frekvencije alela koje su korištene za izračun  $\chi^2$  testa prikazane su u tablici 8.

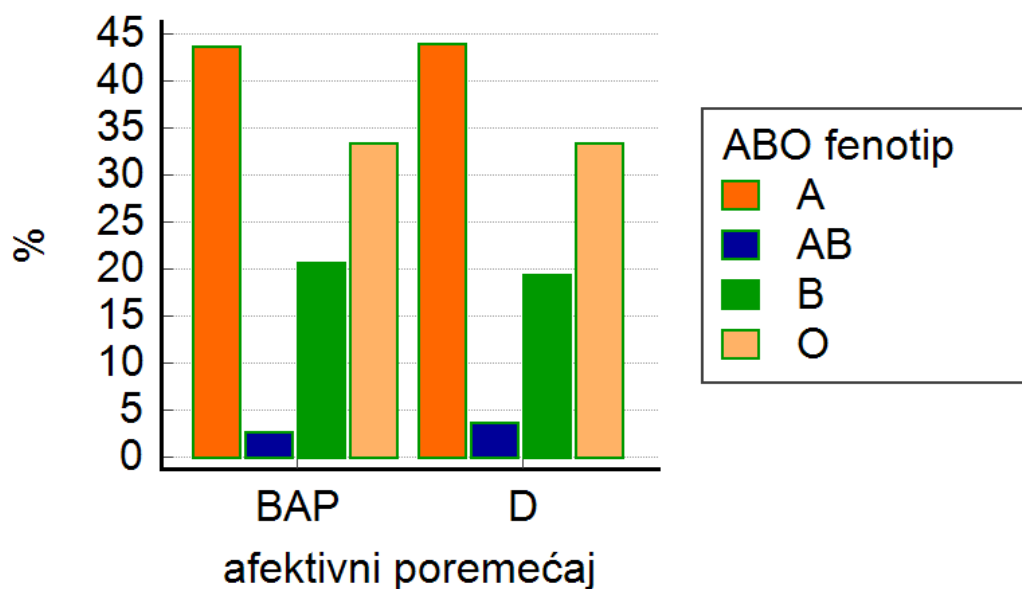
Tablica 8. Prikaz apsolutnih frekvencija pojedinih alela u skupini bolesnica i kontrolnoj skupini

ABO aleli	Skupina ispitanika (n)	Kontrolna skupina (n)	Ukupno (n)
A1	40	69	109
A2	12	10	22
B	25	29	54
O1	110	135	245
O2	5	3	8
Ukupno (n)	192	246	438

#### 4.1.5. Usporedba raspodjele ABO fenotipova unutar skupine bolesnica

Raspodjela ABO krvnih grupa kod pacijentica oboljelih od BAP-a je slijedeća: krvna grupa A (43,59 %), krvna grupa O (33,33 %), krvna grupa B (20,51 %) te krvna grupa AB (2,56 %).

Pacijentice s depresijom također najviše imaju krvnu grupu A (43,86 %), pa krvnu grupu O (33,33 %), krvnu grupu B (19,30 %) i na kraju krvnu grupu AB (3,50 %) (Slika 5).



Slika 5. Usporedba relativnih frekvencija ABO fenotipova između pacijentica s bipolarnim afektivnim poremećajem (BAP) i pacijentica sa depresijom.  
BAP-pacijentice s bipolarnim afektivnim poremećajem, D-pacijentice oboljele od depresije

Fisherovim egzaktnim testom nije dokazana statistički značajna razlika u zastupljenosti ABO fenotipova između pacijentica oboljelih od BAP-a i pacijentica oboljelih od depresije. P vrijednost iznosi 1,000. Apsolutne frekvencije ABO fenotipova unutar ispitivane skupine prikazane su u tablici 9.

Tablica 9. Usporedba apsolutnih frekvencija ABO fenotipova kod pacijenata s BAP-om i depresijom

ABO fenotip	Pacijentice s BAP (n)	Pacijentice sa depresijom (n)	Ukupno (n)
O	13	19	32
A	17	25	42
B	8	11	19
AB	1	2	3
Ukupno (n)	39	57	96

## 4.2. Rasprava

Zanimljivo je da otprilike polovica stanovnika Japana, Koreje i Tajvana vjeruje da je osobnost vezana uz ABO krvnu grupu, a teorija osobina ličnosti prema ABO krvnim grupama koja ima najviše utjecaja na današnja istraživanja jest ona japanske znanstvenice Nomi iz 1971., prema kojoj su osobe krvne grupe A pedantne i nervozne, osobe krvne grupe B samouvjerene i egocentrične, dok su osobe krvne grupe O „velikog srca“ i opušteno, a osobe krvne grupe AB imaju dvojnu osobnost i teško ih je razumjeti (Kanazawa, 2021.). Još od doba antike, kada su Hipokrat, a kasnije i Galen, tvrdili da su određene tjelesne tekućine odgovorne za specifične tipove osobnosti i oblike psihopatologije, postoji hipoteza da je depresija povezana s osobnošću (Klein i sur, 2011.).

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) definira mentalno zdravlje kao stanje dobrobiti u kojem svaki čovjek shvaća svoj potencijal i može se nositi s normalnim životnim stresovima, raditi produktivno i plodonosno i može doprinositi svojoj zajednici (psihonet.hr).

Depresija je kronična bolest čija prevalencija sve više raste, a daje veliki doprinos globalnom teretu bolesti. Globalni teret bolesti mjeri se parametrom DALY (engl. Disability Adjusted Life Year), a označava ukupan broj godina proživljenih s nesposobnošću i izgubljenih godina zbog bolesti. Smatra se da će do 2030. veliki depresivni poremećaj preuzeti najveći udio globalnoga tereta bolesti, a već sada je vodeći kod žena. Naime, istraživanja pokazuju da žene 1,7 puta češće obolijevaju od depresije nego muškarci. Različita predispozicija za depresiju pripisuje se prvenstveno biološkim spolnim razlikama, a manje ovisi o rasi, kulturi, prehrani, obrazovanju i drugim društvenim i ekonomskim čimbenicima. U razvoju depresije važni su i određeni periodi u životu žena kada su osobito podložne (pubertet, fertilno doba, menopauza i dr.). Istraživanja na majmunima i glodavcima pokazala su da ženski spolni hormoni, a osobito estrogen, pružaju zaštitni učinak protiv obolijevanja od depresije te da smanjenje razine estrogena može povećati rizik za razvoj depresije. U skladu s tim, čini se da se taj rizik povećava u perimenopauzalnom razdoblju žena, kada pada razina estrogena. Mogli bi se pitati, ako estrogen ima zaštitnu ulogu, zašto onda muškarci ne obolijevaju češće od žena, no otkriveno je da se testosteron u muškom mozgu pretvara u estrogen pomoću endogene aromataze (CYP 19). Točan mehanizam djelovanja genetskih razlika, koji je odgovoran za različite predispozicije za mentalne bolesti između muškaraca i žena zapravo tek treba razjasniti (Albert, 2015.). Međutim, životne okolnosti koje više doprinose razvoju depresije kod žena nego kod muškaraca su: nejednaka moć i status žena u usporedbi s muškarcima, opterećenje žena radom izvan kuće



i radom kućanskih poslova te brigom o djeci i starijim članovima obitelji i iskustvo seksualnoga ili fizičkoga zlostavljanja, koje češće dožive žene nego muškarci ([www.mayoclinic.org](http://www.mayoclinic.org)). 2017. godine provedeno je istraživanje u SAD-u koje je proučavalo upravo spolnu razliku u dijagnosticiranju velikoga depresivnog poremećaja u dvjema meta-analizama, na ukupno više od 1,7 milijuna žena i muškaraca. Dobiveni omjer izgleda (OR) za spolne razlike iznosi 1,95, što znači da je ženama 1,95 puta više dijagnosticiran veliki depresivni poremećaj nego muškarcima. Spolna razlika u obolijevanju od depresije pojavila se ranije nego što se mislilo, s OR 2,37, u dobi od 12 godina. U obje meta-analize utvrđeno je da je spolna razlika zapravo najveća u doba adolescencije (OR=3.02 u dobi od 13 do 15 godina), a da nakon adolescencije pada i ostaje relativno stabilna u odraslo doba. Još jedno otkriće te studije je to da su pronađene veće spolne razlike u dijagnosticiranju velikoga depresivnog poremećaja kod predstavnika nacija gdje postoji veća ravnopravnost spolova (Salk i sur., 2017.).

U ovom radu ispitana je povezanost između ABO sustava krvnih grupa, BAP-a i depresije istraživanjem parova skupine 96 pacijentica i 123 zdravih žena. Povezanost je ispitivana na 3 razine: fenotipskoj, genotipskoj te na razini alela. Dobivena p vrijednost utvrđena  $\chi^2$  testom za usporedbu 4 ABO fenotipa iznosi 0,579, a za razdiobu ABO alela iznosi 0,323. Za usporedbu učestalosti ABO genotipova korišten je Fisherov egzaktni test, a utvrđena p vrijednost iznosi 0,599. Dobivene p vrijednosti veće su od razine statističke značajnosti stoga ispitivana povezanost nije utvrđena na sve tri razine. Istodobno je provedeno i ispitivanje razlike u zastupljenosti ABO krvnih grupa između dviju skupina oboljelih, tj. pacijentica s BAP-om i pacijentica s depresijom. Fisherovim egzaktnim testom pokazano je da razlika ne postoji, uz p vrijednost od 1,000.

Rezultati dosadašnjih istraživanja o povezanosti između BAP-a, depresije i ABO krvnih grupa nisu usuglašeni. Ukoliko povezanost postoji, smatra se da bi ona mogla biti vezana uz neurotransmitere, čija je neravnoteža važna za nastanak poremećaja raspoloženja. Temeljni mehanizmi nastanka BAP-a i velikoga depresivnog poremećaja još nisu u potpunosti razjašnjeni, ali na snazi je monoaminska hipoteza prema kojoj ključnu ulogu u poremećajima raspoloženja imaju monoaminski inhibitori serotonin, dopamin i noradrenalin. Značajna uloga serotonina u velikom depresivnom poremećaju potvrđena je genskim, biološkim i farmakološkim studijama. Dopamin i norepinefrin, osim u kognitivnoj funkciji, imaju važnu ulogu u regulaciji emocija te postoje dokazi da uz serotonin, neregulirani prijenos dopamina i noradrenalina također daju doprinos razvoju velikoga depresivnog poremećaja i BAP-a. Najnovije studije ukazale su također da enzim dopamin-beta-hidroksilaza (DBH), koji

katalizira pretvorbu dopamina u noradrenalin i koji je važan za održavanje ravnoteže dopamina i noradrenalina, ima ulogu u nastanku BAP-a i velikoga depresivnog poremećaja (Sun i sur, 2021.). Ates i sur. pokazali su da je polimorfizam *DB3* gena 1603C>T povezan s osjetljivošću na BAP u turskoj populaciji, a Zhou i sur. izvijestili su da bi polimorfizam *DBH 5'-Ins/Del* mogao biti povezan s osjetljivošću na veliki depresivni poremećaj u kineskoj populaciji. Neka starija istraživanja pokazala su da je aktivnost *DBH* pojačana u bipolarnom afektivnom poremećaju, dok je u depresiji smanjena (Vuk Pisk i sur., 2018.). Sun i sur. utvrdili su da je niža aktivnost *DBH* povezana s izraženijim tjeskobnim ili depresivnim simptomima u BAP-u na istraživanju od ukupno 365 ispitanika: 104 osobe oboljele od velikoga depresivnog poremećaja, 101 pacijenta s BAP-om i 160 zdravih osoba koji su činili kontrolnu skupinu (Sun i sur., 2021.). Otkriće da je *DBH* gen smješten također blizu gena *ABO* na kromosomu 9q34 (Morison, 2004.; Hobgood, 2011.), čime postoji mogućnost da *ABO* gen utječe na *DBH* gen i pridonosi riziku za razvoj afektivnih poremećaja, iznimno je bitno u istraživanju ove teme. Ista veza između *ABO* gena i *DBH* gena proučava se u povezanosti osobina ličnosti i ABO krvnih grupa, što je osobito popularno kod Japanaca. Obzirom da je aktivnost katekolamina povezana s tipovima osobnosti, ukoliko postoji korelacija između gena za katekolamina i ABO krvnih grupa, to bi moglo objasniti povezanost između ABO krvnih grupa i osobina ličnosti (Hobgood, 2011.). Kanawaza je na uzorku od 3.750 sudionika, koji su ispunjavali upitnik za samoprocjenjenu osobina ličnosti, potvrdio teoriju osobina ličnosti prema ABO krvnim grupama. Međutim, to je ispitivanje provedeno samo na japanskoj populaciji (Kanazawa, 2021.).

Ranije istraživanje o povezanosti ABO sustava krvnih grupa i psihijatrijskih poremećaja provedeno u Hrvatskoj (Vuk Pisk i sur, 2018.) te veliko istraživanje o odnosu ABO krvnih grupa i velikom depresivnom poremećaju autora Garvert i sur. (Garvert i sur., 2021.) iznijeli su različite rezultate. U hrvatsku je studiju bilo uključeno 156 psihijatrijskih pacijenata te je usporedbom razdiobe ABO genotipova s kontrolnom skupinom pronađena značajno veća pojavnost krvne grupe AB u ispitivanoj skupini tj. značajno veća učestalost A1B genotipa kod ispitanika. Omjerom izgleda dobiveno je da se psihijatrijski poremećaji pojavljuju skoro 3 puta češće u osoba krvne grupe AB, u usporedbi s drugim krvnim grupama. Međutim, ispitivanjem povezanost ABO krvnih grupa sa različitim psihijatrijskim poremećajima (poremećaji raspoloženja, psihotični poremećaji, ovisnosti, poremećaj osobnosti) nije pronađena statistički značajna razlika. Također, ispitivali su i povezanost između ABO krvnih grupa i određenih karakteristika psihijatrijskih pacijenata (spol, psihijatrijsko nasljeđe, somatski komorbiditeti, suicidalnost) te nije utvrđena statistički značajna razlika. U prijašnjim studijama pronađeno je

brže lučenje dušikovog oksida (NO) kod osoba krvne grupe B i AB. NO je ključan neuroupalni regulator pa se smatra važnim za razvoj depresije i drugih psihičkih bolesti (Vuk Pisk i sur., 2018). Najnovija meta studija koju je provela njemačka autorica Garvert i sur. (Garvert i sur., 2021.) proučavala je povezanost između ABO krvnih grupa i velikog depresivnog poremećaja analizom podataka iz 26 *case-control* istraživanja diljem svijeta od EU, SAD do Australije kao dio zadaće radne skupine Konzorcija za psihijatrijsku genomiku (engl. *Psychiatric Genomics Consortium*). Analizirali su podatke o 37.208 osoba, od kojih je 41,6 % tijekom života imalo dijagnosticiran veliki depresivni poremećaj.  $\chi^2$ -testom nije utvrđena značajna povezanost između velikoga depresivnog poremećaja i distribucije ABO krvnih grupa. Zapravo, niti jedna od četiri regresijske analize, koje su procjenjivale povezanost između pojedinih krvnih grupa i velikoga depresivnog poremećaja, nije dosegla statističku značajnost. Sekundarne analize, koje su ispitivale i učinke interakcije ABO krvnih grupa i spola na rizik od velikog depresivnoga poremećaja, također nisu dosegle statistički značaj (Garvert i sur., 2021.).

Rezultati ovoga istraživanja u skladu su s istraživanjem Garvert i suradnika (Garvert i sur., 2021.). Svakako treba navesti i ograničavajuće čimbenike ove studije koje mogu dovesti posljedično do pogrešnih zaključaka. Prvi je nedostatak ovoga istraživanja mali broj ispitanika na uzorku od 96 pacijentica oboljelih od BAP-a i depresije, posebno ako ga se usporedi s analiziranim brojem podataka svjetskoga Konzorcija za psihijatrijsku genomiku. Sljedeći nedostatak ovoga ispitivanja predstavlja i činjenica da je skupina bolesnica statistički značajno starija od kontrolne skupine, čime su osobe u kontrolnoj skupini imale manje vremena za moguće obolijevanje od BAP-a i depresije, što potencijalno može dovesti do krivih zaključaka. Razlike u dokazivanju povezanosti afektivnih poremećaja/depresije s ABO krvnom grupom moguće je pripisati i populacijskim razlikama u razdiobi ABO krvnih grupa i navedenih bolesti. U ovu su studiju bile uključene samo bolesnice tako da bi istu hipotezu vrijedilo provjeriti i na muškim pacijentima.

S obzirom na različite rezultate dosadašnjih studija o tome utječe li ABO sustav krvnih grupa na rizik za razvoj poremećaja raspoloženja te da nedostaju istraživanja na većem broju ispitanika, potrebno je nastaviti proučavati ovo područje od interesa uz potencijalne čimbenike koji mogu sudjelovati u obolijevanju, kao što je enzim DBH i dr. te uključiti osobe muškoga spola u daljnja istraživanja.

## 5. ZAKLJUČCI

- Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati postoji li povezanost između genotipova ABO sustava krvnih grupa i obolijevanja od BAP-a i depresije u populaciji Hrvatske.
- Rezultati statističkih testova ove retrospektivne studije istraživanjem parova skupine 96 pacijentica s dijagnozom BAP-a i depresije te skupine od 123 kontrolne ispitanice pokazali su da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih ABO genotipova između ispitivanih skupina, što znači da povezanost nije dokazana.
- Utvrđeno je da ne postoji značajna razlika u zastupljenosti ABO krvnih grupa između bolesnica i kontrolne skupine ( $\chi^2=1,967$ ,  $df=3$ ,  $p=0,579$ ).
- Utvrđeno je da razlika u razdiobi ABO genotipova između kontrolne skupine i skupine bolesnica nije značajna ( $p=0,599$ ) te da se raspodjela ABO alela između te dvije skupine također ne razlikuje značajno ( $\chi^2=4,658$ ,  $df=4$ ,  $p=0,323$ ).
- S obzirom da su skupinu ispitanica činile skupine pacijentica različitih bolesti, ispitano je razlikuju li se one međusobno u raspodjeli ABO krvnih grupa te je utvrđeno da se raspodjela ABO krvnih grupa statistički značajno ne razlikuje između pacijentica s bipolarnim poremećajem i pacijentica s depresijom ( $p=1,000$ ).
- S obzirom da su neke studije ukazale na povezanost između ABO sustava krvnih grupa, osobnosti i poremećaja raspoloženja, kao i drugih čimbenika kao što su npr. neka razdoblja u životu žena (pubertet, fertilno doba, menopauza i dr.), utjecaj ABO krvnih grupa na rizik od razvoja depresije i BAP-a trebalo bi nastaviti ispitivati u većim istraživanjima te uključiti pripadnike muškoga spola.

## 6. LITERATURA

Abegaz SB, Human ABO Blood Groups and Their Associations with Different Diseases. Biomed Res Int. 2021, 2021:6629060

Affective Disorders, <https://www.healthline.com/health/affective-disorders>, pristupljeno 8.10.2021.

Albert PR, Why is depression more prevalent in woman? J Psychiatry Neurosci, 2015, 40, 219–221.

Alexander KS, Zakai NA, Gillett S, McClure LA, Wadley V, Unverzagt F, Cushman M, ABO blood type, factor VIII, and incident cognitive impairment in the REGARDS cohort. Neurology, 2014, 83, 1271–1276.

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

Beach SR, Whisman MA, Affective disorders. J Marital Fam Ther. 2012, 38, 201-219.

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

Bipolar Disorder, 2018, <https://www.nimh.nih.gov/health/publications/bipolar-disorder>, pristupljeno 8.10.2021.

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 PK. InTech, 2012, str. 3.-22.

Depression, 2021, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>, pristupljeno 8.10. 2021.

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

Garvert L, Baune BT, Berger K, Boomsma DI, Breen G, Greinacher A, Hamilton SP, Levison DF, Lewia CM, Lucae S, Manusson PKE, Martin NG, McIntosh AM, Mors O, Muller-Myhsok B, Penninx BWJH, Perlis RH, Pistis G, Auwera S, The association between genetically determined ABO blood types and major depressive disorder. Psychiatry Res. 2021, 299, 113837.

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

Globalno mentalno zdravlje, 2021, <https://psihonet.net/globalno-mentalno-zdravlje/>, pristupljeno 25.10. 2021.

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

Groot HE, Vilegas Sierra LE, Abdullah Said M, Lipsic E, Karper JC, Pim H, Genetically Determined ABO Blood Group and its Associations With Health and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40, 830–838.

Hammen C, Risk Factors for Depression: An Autobiographical Review. *Annu Rev Clin Psychol*, 2018, 14, 1-28.

Hobgood DK, Personality traits of aggression-submissiveness and perfectionism associate with ABO blood groups through catecholamine activities. *Medical Hypotheses*, 2011, 77, 294-300.

Kanazawa M, Relationship between ABO Blood Type and Personality in a Large-scale Survey in Japan. *International Journal of Psychology and Behavioral Sciences*, 2021, 11, 6-12.

Kerner B, Toward a deeper understanding of the genetics of bipolar disorder. *Front Psychiatry*, 2015, 6, 105.

Klein DN, Kotov R, Bufferd SJ, Personality and Depression: Explanatory Models and Review of the Evidence. *Annu Rev Clin Psychol*, 2011, 7, 269–295.

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

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

Kundid R. Radna uputa „QIACube izolacijukleinskih kiselina“ (RU-OMD-033). Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Odjel za molekularnu dijagnostiku, Zagreb, 2021.

Liumbruno GM, Franchini M, Beyond immunohaematology: the role of the ABO blood group in human diseases. *Blood Transfus*, 2013, 11, 491-499.

Depression in women: Understanding the gender gap, 2019, <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/depression/in-depth/depression/art-20047725>, pristupljeno 21.10.2021.

Mental disorders, 2019, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>, pristupljeno 8.10.2021.

Moller HJ, Suicide, suicidality and suicide prevention in affective disorders. *Acta Psychiatr Scand*, 2003, 108, 73–80.

Morison J, Exploring the link between ABO blood-group philosophy and the stress-response, *Eur J Clin Hypnosis*, 2004, 5, 16-30.

O krvi, <https://www.hztm.hr>, pristupljeno 08.10.2021.

Percepcija stresa i oboljenja medicinskih sestara i tehničara u psihijatriji, 2021, [https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id\\_clanak\\_jezik=380391](https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=380391), pristupljeno 21.10.2021.

Rihmer Z, Arato M, ABO blood group in manic-depressive patients. *J Affect Disord*, 1981, 3, 1-7.

Rinieris PM, Stefanis CN, Lykouras EP, Varsou EK, Affective disorders and ABO blood types. *Acta Psychiatr Scand*, 1979, 60, 272-278.

Salk RH, Hyde JS, Abramson LY, Gender Differences in Depression in Representative National Samples: Meta-Analyses of Diagnoses and Symptoms. *Psychol Bull*, 2017, 143, 783–822.

Shapiro RW, Rafaelsen OJ, Ryder LP, Svejgaard A, Sorensen H, ABO Blood Groups in Unipolar and Bipolar Manic-Depressive Patients. *Am J Psychiatry*, 1977, 134, 197-200.

Sun Z, Bo Q, Mao Z, Li F, He F, Pao C, Li W, He Y, Ma X, Wang C, Reduced Plasma Dopamine- $\beta$ -Hydroxylase Activity Is Associated With the Severity of Bipolar Disorder: A Pilot Study. *Front Psychiatry*, 2021, 12, 566091

Takawaza N, Kimura T, Nanko S, Blood Groups and Affective Disorders. *Jpn J Psychiatry Neurol*, 1988, 42, 753-758.

Tsuang MT, Faraone SV, The genetic epidemiology of bipolar disorder. U: Bipolar Disorders Marneros A, Angst J, urednici, Dordrecht, Springer, 2000, str. 231-234.

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.

Watkins WM, The ABO blood group system: historical background. Transfusion Medicine, 2001, 11, 243-265.

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

Yamamoto F, Molecular genetics and genomics of the ABO blood group system. Ann Blood, 2021, 6, 25.

Zhang H, Mooney CJ, Reilly MP, ABO Blood Groups and Cardiovascular Diseases. Int J Vasc Med, 2012, 2012: 641917.

Zonda T, Lester D, Blood type and bipolar disorder. Percept Mot Skills, 2002, 95, 988.



## 7. SAŽETAK/SUMMARY

### 7.1. Sažetak

Depresija je kronični poremećaj koji oboljele onesposobljava za kvalitetan život, a utječe i na živote njihovih bliskih ljudi. Osim depresivnog raspoloženja i gubitka uživanja u gotovo svim aktivnostima, dolazi i do značajne promjene apetita, kvalitete spavanja, osjećaja umora i gubitka energije, bezvrijednosti ili pretjerane krivnje, smanjene sposobnosti koncentracije i ponovljenih razmišljanja o smrti ili suicidu. Prevalencija velikog depresivnog poremećaja u svijetu sve više raste, a smatra se da će do 2030. godine preuzeti glavni udio u globalnom teretu bolesti. Bipolarni afektivni poremećaj (BAP), kao i depresija, svrstava se u afektivne poremećaje, a karakteriziraju ga epizodne izmjene osjećaja ushićenosti, energičnosti i razdražljivosti te s druge strane, osjećaja ravnodušnosti, tuge i beznađa. Dosadašnja istraživanja povezanosti ABO sustava krvnih grupa i afektivnih poremećaja dala su kontradiktorne rezultate. Cilj ovoga rada bio je ispitati povezanosti između ABO sustava krvnih grupa, BAP-a i depresije u populaciji Hrvatske. Istraživanje parova provedeno je usporedbom žena s dijagnozom BAP-a ili depresije i kontrolne skupine. Proučavane su samo žene, obzirom da one češće obolijevaju od depresije, 96 pacijentica s dijagnozom BAP-a (n=39) ili depresije (n=57), a kontrolnu skupinu činilo je 123 zdrave darivateljice krvi. Bolesnicama je izolirana genomska DNA iz uzorka pune krvi na QIAcube uređaju za automatsku izolaciju nukleinskih kiselina. *In house* metodom alel-specifične lančane reakcije polimeraze (PCR-SSP) provedena je genotipizacija za 5 osnovnih ABO alela (O1, O2, A1, A2, B) i 15 ABO genotipova. Povezanost je ispitivana na 3 razine: fenotipskoj, genotipskoj te na razini alela. Dobivena p vrijednost utvrđena  $\chi^2$  testom za usporedbu ABO fenotipa iznosi 0,579, a za razdiobu ABO alela iznosi 0,323. Za usporedbu učestalosti ABO genotipova korišten je Fisherov egzaktni test, a utvrđena p vrijednost iznosi 0,599. Dobivene p vrijednosti veće su od razine statističke značajnosti stoga ispitivana povezanost nije utvrđena na navedene sve tri razine. Ispitivana je i razlika razdiobe ABO krvnih grupa između pacijentica sa BAP-om i pacijentica s depresijom, no razlika nije statistički dokazana (p=1,000). Rezultati ovoga rada upućuju na to da ABO sustav ne doprinosi razvoju BAP-a i depresije i u skladu je sa većinom dosad provedenih studija u svijetu. S obzirom da je ovo područje od interesa, potrebno je nastaviti istraživanja potencijalnih čimbenika koji

mogu sudjelovati u nastanku BAP-a odnosno depresije, kao što je enzim dopamin-beta-hidroksilaza (DBH), neurotransmiteri i dr. te u istraživanje uključiti osobe muškoga spola.

**Ključne riječi:** ABO krvne grupe, ABO genotipizacija, bipolarni afektivni poremećaj, depresija

## 7.2. Summary

Depression is a chronic disorder that disables patients for a quality life, and also affects the lives of their loved ones. In addition to depressed mood and loss of pleasure in almost all activities, there is a significant change in appetite, sleep quality, feelings of fatigue and loss of energy, worthlessness or excessive guilt, decreased ability to concentrate and repeated thoughts of death or suicide. The prevalence of major depressive disorder in the world is growing, and it is estimated that by 2030 it would be a major cause in the global burden of the disease. Bipolar disorder as well as depression, is classified as an affective disorder and is characterized by episodic changes in feelings of elation, energy and irritability, and on the other hand, feelings of indifference, sadness and hopelessness. So far, there is much research on the association of ABO blood group systems and affective disorders that have yielded contradictory results. The aim of this study was to examine the association between ABO blood group system, bipolar disorder and depression in the Croatian population. The case-control study comparing women diagnosed with bipolar disorder or depression and the control group. Only women were studied, as they were more likely to suffer from depression, 96 patients diagnosed with bipolar disorder (n=39) or depression (n=57), and the control group consisted of 123 healthy blood donors. Genomic DNA was isolated on a QIAcube device for automatic nucleic acid isolation. Genotyping on 5 basic ABO alleles (O1, O2, A1, A2, B) and 15 ABO genotypes was performed by the *in house* method of allele-specific polymerase chain reaction (PCR-SSP). The association was examined at 3 levels: phenotypic, genotypic and allelic. The obtained p value determined by the  $\chi^2$  test for the comparison of the ABO phenotype was 0.579, and for the distribution of the ABO allele was 0.323. Fisher's exact test was used to compare the frequency of ABO genotypes, and the determined p value was 0.599. The obtained p values are higher than the level of statistical significance, therefore the examined correlation was not determined at all three mentioned levels. The difference in the distribution of ABO blood groups between patients with bipolar disorder and those with depression was also examined, but the difference was not statistically significant ( $p = 1,000$ ). The results of this study suggest that the ABO blood group system does not contribute to the development of bipolar disorder and depression. This is consistent with most conducted studies so far in the world. The research of this area of interest, should be continued on potential factors that may be involved in the disease, such as the enzyme dopamine beta hydroxylase (DBH), neurotransmitters, etc., and to include males in

further research.

**Key words:** ABO blood groups, ABO genotyping, bipolar disorder, depression

## 8. PRILOZI

### 8.1. Kratice

DNA= deoksiribonukleinska kiselina

dNTP= deoksiribonukleotid-trifosfat

EDTA= etilendiamintetraoctena kiselina

FUT1- gen fukozil-transferaza 1

FUT2- gen fukozil-transferaza 2

## 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

### ISPITIVANJE POVEZANOSTI IZMEĐU ABO SUSTAVA KRVNIH GRUPA, BIPOLARNOG POREMEĆAJA I DEPRESIJE

Matea Lehki

#### SAŽETAK

Depresija je kronični poremećaj koji oboljele onesposobljava za kvalitetan život, a utječe i na živote njihovih bliskih ljudi. Osim depresivnog raspoloženja i gubitka užitivanja u gotovo svim aktivnostima, dolazi i do značajne promjene apetita, kvalitete spavanja, osjećaja umora i gubitka energije, bezvrijednosti ili pretjerane krivnje, smanjene sposobnosti koncentracije i ponovljenih razmišljanja o smrti ili suicidu. Prevalencija velikog depresivnog poremećaja u svijetu sve više raste, a smatra se da će do 2030. godine preuzeti glavni udio u globalnom teretu bolesti. Bipolarni afektivni poremećaj (BAP), kao i depresija, svrstava se u afektivne poremećaje, a karakteriziraju ga epizodne izmjene osjećaja ushićenosti, energičnosti i razdražljivosti te s druge strane, osjećaja ravnodušnosti, tuge i beznađa. Dosadašnja istraživanja povezanosti ABO sustava krvnih grupa i afektivnih poremećaja dala su kontradiktorne rezultate. Cilj ovoga rada bio je ispitati povezanosti između ABO sustava krvnih grupa, BAP-a i depresije u populaciji Hrvatske. Istraživanje parova provedeno je usporedbom žena s dijagnozom BAP-a ili depresije i kontrolne skupine. Proučavane su samo žene, obzirom da one češće obolijevaju od depresije, 96 pacijentica s dijagnozom BAP-a ( $n=39$ ) ili depresije ( $n=57$ ), a kontrolnu skupinu činilo je 123 zdrave darivateljice krvi. Bolesnicama je izolirana genomski DNA iz uzorka pune krvi na QIAcube uređaju za automatsku izolaciju nukleinskih kiselina. *In house* metodom alel-specifične lančane reakcije polimeraze (PCR-SSP) provedena je genotipizacija za 5 osnovnih ABO alela (O1, O2, A1, A2, B) i 15 ABO genotipova. Povezanost je ispitivana na 3 razine: fenotipskoj, genotipskoj te na razini alela. Dobivena  $p$  vrijednost utvrđena  $\chi^2$  testom za usporedbu ABO fenotipa iznosi 0,579, a za razdiobu ABO alela iznosi 0,323. Za usporedbu učestalosti ABO genotipova korišten je Fisherov egzaktni test, a utvrđena  $p$  vrijednost iznosi 0,599. Dobivene  $p$  vrijednosti veće su od razine statističke značajnosti stoga ispitivana povezanost nije utvrđena na navedene sve tri razine. Ispitivana je i razlika razdiobe ABO krvnih grupa između pacijentica sa BAP-om i pacijentica s depresijom, no razlika nije statistički dokazana ( $p=1,000$ ). Rezultati ovoga rada upućuju na to da ABO sustav ne doprinosi razvoju BAP-a i depresije i u skladu je sa većinom dosad provedenih studija u svijetu. S obzirom da je ovo područje od interesa, potrebno je nastaviti istraživanja potencijalnih čimbenika koji mogu sudjelovati u nastanku BAP-a odnosno depresije, kao što je enzim dopamin-beta-hidroksilaza (DBH), neurotransmiteri i dr. te u istraživanje uključiti osobe muškoga spola.

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

Rad sadrži: 39 stranica, 5 grafičkih prikaza, 9 tablica i 44 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ABO krvne grupe, ABO genotipizacija, bipolarni afektivni poremećaj, depresija

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. Jasna-Bingulac Popović**, znanstvena savjetnica, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu  
**Dr. sc. Karmela Barišić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Donatella Verbanac**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: studeni 2021.

## 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

### EXAMINING THE ASSOCIATION BETWEEN ABO BLOOD GROUP SYSTEM, BIPOLAR DISORDER AND DEPRESSION

Matea Lehki

#### SUMMARY

Depression is a chronic disorder that disables patients for a quality life, and also affects the lives of their loved ones. In addition to depressed mood and loss of pleasure in almost all activities, there is a significant change in appetite, sleep quality, feelings of fatigue and loss of energy, worthlessness or excessive guilt, decreased ability to concentrate and repeated thoughts of death or suicide. The prevalence of major depressive disorder in the world is growing, and it is estimated that by 2030 it would be a major cause in the global burden of the disease. Bipolar disorder as well as depression, is classified as an affective disorder and is characterized by episodic changes in feelings of elation, energy and irritability, and on the other hand, feelings of indifference, sadness and hopelessness. So far, there is much research on the association of ABO blood group systems and affective disorders that have yielded contradictory results. The aim of this study was to examine the association between ABO blood group system, bipolar disorder and depression in the Croatian population. The case-control study comparing women diagnosed with bipolar disorder or depression and the control group. Only women were studied, as they were more likely to suffer from depression, 96 patients diagnosed with bipolar disorder (n=39) or depression (n=57), and the control group consisted of 123 healthy blood donors. Genomic DNA was isolated on a QIAcube device for automatic nucleic acid isolation. Genotyping on 5 basic ABO alleles (O1, O2, A1, A2, B) and 15 ABO genotypes was performed by the *in house* method of allele-specific polymerase chain reaction (PCR-SSP). The association was examined at 3 levels: phenotypic, genotypic and allelic. The obtained p value determined by the  $\chi^2$  test for the comparison of the ABO phenotype was 0.579, and for the distribution of the ABO allele was 0.323. Fisher's exact test was used to compare the frequency of ABO genotypes, and the determined p value was 0.599. The obtained p values are higher than the level of statistical significance, therefore the examined correlation was not determined at all three mentioned levels. The difference in the distribution of ABO blood groups between patients with bipolar disorder and those with depression was also examined, but the difference was not statistically significant ( $p = 1,000$ ). The results of this study suggest that the ABO blood group system does not contribute to the development of bipolar disorder and depression. This is consistent with most conducted studies so far in the world. The research of this area of interest, should be continued on potential factors that may be involved in the disease, such as the enzyme dopamine beta hydroxylase (DBH), neurotransmitters, etc., and to include males in further research.

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

Thesis includes: 39 pages, 5 figures, 9 tables and 44 references. Original is in Croatian language.

Keywords: ABO blood groups, ABO genotyping, bipolar disorder, depression

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: **Jasna Bingulac-Popović, Ph.D.** Scientific Adviser, Croatian institute of Transfusion Medicine  
**Karmela Barišić, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Donatella Verbanac, Ph.D.** Associate Profesor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2021.