

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Gordana Tomac

**MOLEKULARNA ISTRAŽIVANJA GENA
SUSTAVA HPA I GENA *HLA-DRB1/3/4/5* KAO
RIZIČNIH ČIMBENIKA FETOMATERNALNE
ALOIMUNIZACIJE NA ANTIGENE HPA**

doktorski rad

Osijek, 2025.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: biologija, temeljne medicinske znanosti

MOLEKULARNA ISTRAŽIVANJA GENA SUSTAVA HPA I GENA *HLA-DRB1/3/4/5* KAO RIZIČNIH ČIMBENIKA FETOMATERNALNE ALOIMUNIZACIJE NA ANTIGENE HPA

Gordana Tomac

Doktorski rad je izrađen u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb

Mentor/i: izv. prof. dr. sc. Branka Golubić Čepulić, prim. dr. med.
prof. dr. sc. Zorana Grubić

Kratki sažetak doktorskog rada:

Fetomaternalna aloimunizacija na antigene HPA može uzrokovati spontane pobačaje te trombocitopeniju novorođenčeta. Ciljevi istraživanja bili su odrediti gene HPA i *HLA-DRB1/3/4/5*, a rezultati su potvrdili da je polimorfizam gena *HLA-DRB1/3/4/5* povezan s fetomaternalnom aloimunizacijom na pojedini specifični antigen HPA. Ove spoznaje će omogućiti bolje razumijevanje fetomaternalne aloimunizacije i kliničkog značenja pojedinih protutijela anti-HPA.

Broj stranica: 100

Broj slika: 20

Broj tablica: 31

Broj literaturnih navoda: 134

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: geni sustava HPA, geni *HLA-DRB1/3/4/5*, fetomaternalna aloimunizacija, antigeni HPA, antigeni ABO

Datum javne obrane:

Povjerenstvo za javnu obranu:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (zamjena)

Doktorski rad je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary area of science

Scientific Fields: biology, basic medical sciences

MOLECULAR STUDIES OF HPA AND *HLA-DRB1/3/4/5* GENES AS A RISK FACTORS FOR FETOMATERNAL ALLOIMUNIZATION TO HPA ANTIGENS

Gordana Tomac

Thesis performed at Clinical hospital centre Zagreb, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb

Supervisor/s: izv. prof. dr. sc. Branka Golubić Čepulić, prim., dr. med.
prof. dr. sc. Zorana Grubić

Short abstract:

Fetomaternal alloimmunization to HPA antigens can cause spontaneous abortions and neonatal thrombocytopenia. The goal of this study was to determine HPA and *DRB1/3/4/5* genes. The results confirmed the association of *HLA-DRB1/3/4/5* genes with fetomaternal alloimmunization to specific HPA antigen. The results of this study will provide new insights in pathophysiology of fetomaternal alloimmunization and clinical significance of certain anti-HPA antibodies.

Number of pages: 100

Number of figures: 20

Number of tables: 31

Number of references: 134

Original in: Croatian

Key words: HPA and *HLA-DRB1/3/4/5* genes, fetomaternal alloimmunization, HPA antigens, ABO antigens

Date of the thesis defense:

Reviewers:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

Thesis deposited in National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Antigeni na membrani trombocita.....	1
1.1.1. Sustav HPA.....	1
1.1.1.1. Nazivlje antigena HPA.....	1
1.1.1.2. Genetski temelj gena HPA.....	2
1.1.1.3. Građa antigena HPA.....	4
1.1.1.4. Uloga antigena HPA.....	4
1.1.1.5. Populacijska istraživanja gena HPA.....	6
1.1.2. Sustav HLA.....	6
1.1.2.1. Nazivlje gena HLA.....	7
1.1.2.2. Nasljeđivanje gena HLA.....	8
1.1.2.3. Građa molekula HLA razreda I i II.....	11
1.1.2.4. Uloga molekula HLA.....	12
1.1.3. Sustav ABO.....	14
1.1.3.1. Nazivlje antigena sustava ABO.....	14
1.1.3.2. Nasljeđivanje gena sustava ABO.....	14
1.1.3.3. Građa i razvoj antigena sustava ABO.....	15
1.1.3.4. Uloga antigena ABO.....	16
1.2. Fetomaternalna aloimunizacija na antigene HPA.....	18
1.2.1. Definicija i patofiziologija fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA.....	18
1.2.2. Fetalna/neonatalna aloimuna trombocitopenija (FNAIT).....	18
1.2.3. Učestalost i specifičnost protutijela na antigene HPA.....	20
2. CILJEVI I HIPOTEZA STRAŽIVANJA.....	23
3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE.....	24
3.1. Ispitanici i prikupljanje uzoraka.....	24
3.2. Metode.....	24
3.2.1. Izolacija DNA majke i novorođenčeta.....	24
3.2.2. Određivanje gena <i>HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -11 i -15</i>	25
3.2.2.1. Umnažanje DNA metodom lančane reakcije polimerazom.....	26

3.2.2.2.	Hibridizacija umnoženih molekula DNA s oligokleotidnim sondama sa sekvencama specifičnim za alele HPA.....	26
3.2.3.	Određivanje gena <i>HLA-DRB1/3/4/5</i>	28
3.2.3.1.	Umnažanje DNA metodom lančane reakcije polimerazom.....	28
3.2.3.2.	Hibridizacija umnoženih molekula DNA oligokleotidnim sondama sa sekvencama specifičnima za alele HLA.....	29
3.2.4.	Pretraživanje protutijela anti-HPA u serumu majki.....	30
3.2.5.	Određivanje antigena sustava ABO majke i novorođenčeta.....	30
3.3.	Statistička obrada podataka.....	31
4.	REZULTATI	33
4.1.	Učestalost alela, genotipova i fenotipova HPA u skupini nesrodnih ispitanica	33
4.1.1.	Učestalost alela i genotipova HPA u skupini nesrodnih ispitanica.....	33
4.1.2.	Učestalost fenotipova HPA u skupini nesrodnih ispitanica.....	35
4.2.	Učestalost alela i genotipova HPA u skupini novorođenčadi	38
4.3.	Analiza nepodudarnosti u antigenima HPA u skupini parova majka/novorođenče	39
4.3.1.	Nepodudarnosti u antigenima HPA u parovima majka/novorođenče.....	39
4.3.2.	Analiza ukupnog broja nepodudarnih antigena HPA u parovima majka/novorođenče.....	42
4.4.	Geni <i>HLA-DRB1/3/4/5</i> i genotipovi <i>HLA-DRB1/DRB1</i>, <i>HLA-DRB3/DRB3</i>, <i>HLA-DRB4/DRB4</i> te <i>HLA-DRB5/DRB5</i> ispitanica s dokazanom nepodudarnošću u samo jednom antigenu HPA s novorođenčetom	43
4.4.1.	Geni <i>HLA-DRB1</i> i genotipovi <i>HLA-DRB1/DRB1</i> ispitanica s dokazanom nepodudarnošću u samo jednom antigenu HPA s novorođenčetom.....	43

4.4.2.	Geni <i>HLA-DRB3</i> i genotipovi <i>HLA-DRB3/DRB3</i> ispitanica s dokazanom nepodudarnošću u samo jednom antigenu HPA s novorođenčetom.....	47
4.4.3.	Geni <i>HLA-DRB4</i> i genotipovi <i>HLA-DRB4/DRB4</i> ispitanica s dokazanom nepodudarnošću u samo jednom antigenu HPA s novorođenčetom.....	48
4.4.4.	Geni <i>HLA-DRB5</i> i genotipovi <i>HLA-DRB5/DRB5</i> ispitanica s dokazanom nepodudarnošću u samo jednom antigenu HPA s novorođenčetom.....	49
4.5.	Nepodudarnosti u antigenima ABO u parovima majka/novorođenče.....	50
4.6.	Protutijela anti-HPA i anti-HLA u skupini ispitanica	50
4.6.1.	Učestalost i specifičnost protutijela anti-HPA te učestalost protutijela anti-HLA u skupini ispitanica.....	50
4.6.2.	Kombinacije protutijela anti-HPA i anti-HLA u skupini ispitanica.....	51
4.7.	Geni <i>HLA-DRB1/3/4/5</i> i genotipovi <i>HLA-DRB1/DRB1</i>, <i>HLA-DRB3/DRB3</i>, <i>HLA-DRB4/DRB4</i> te <i>HLA-DRB5/DRB5</i> u skupini ispitanica s protutijelima anti-HPA.....	52
4.7.1.	Geni <i>HLA-DRB1/3/4/5</i> u skupini ispitanica s protutijelima anti-HPA.....	52
4.7.2.	Genotipovi <i>HLA-DRB1/DRB1</i> , <i>HLA-DRB3/DRB3</i> , <i>HLA-DRB4/DRB4</i> i <i>HLA-DRB5/DRB5</i> u skupini ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA.....	53
4.8.	Protutijela anti-HPA ispitanica čija novorođenčadi je imala FNAIT	54
4.8.1.	Učestalost i specifičnost protutijela anti-HPA u skupini ispitanica čija novorođenčad je imala FNAIT.....	54
4.8.2.	Kombinacije protutijela anti-HPA i anti-HLA u skupini ispitanica čija je novorođenčadi imala FNAIT.....	55
4.9.	Geni <i>HLA-DRB1/3/4/5</i> i genotipovi <i>HLA-DRB1/DRB1</i>, <i>HLA-DRB3/DRB3</i>, <i>HLA-DRB4/DRB4</i> i <i>HLA-DRB5/DRB5</i> u skupini ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA čija novorođenčad je imala FNAIT.....	56

4.9.1.	Geni <i>HLA-DRB1/3/4/5</i> u skupini ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA čija novorođenčad je imala FNAIT.....	56
4.9.2.	Genotipovi <i>HLA-DRB1/DRB1</i> , <i>HLA-DRB3/DRB3</i> , <i>HLA-DRB4/DRB4</i> i <i>HLA-DRB5/DRB5</i> ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA čija novorođenčad je imala FNAIT.....	58
4.10.	Povezanost pojedinih alela gena <i>HLA-DRB1/3/4/5</i> i fetomaterne aloimunizacije ispitanica na antigene HPA.....	60
4.11.	Povezanost nepodudarnosti u antigenima HPA u skupini parova majka/novorodenče i fetomaterne aloimunizacije ispitanica na antigene HPA i HLA.....	62
4.12.	Povezanost nepodudarnosti u antigenima ABO u skupini parova majka/novorodenče i fetomaterne aloimunizacije ispitanica na antigene HPA i HLA.....	62
4.13.	Povezanost ABO krvne grupe u skupini ispitanica i fetomaterne aloimunizacije ispitanica na antigene HPA i HLA.....	63
4.14.	Povezanost broja poroda ispitanica i fetomaterne aloimunizacije ispitanica na antigene HPA i HLA.....	64
4.15.	Povezanost protutijela anti-HLA u skupini ispitanica i fetomaterne aloimunizacije ispitanica na antigene HPA.....	65
4.16.	Povezanost alela <i>HLA-DRB3*01:01</i> i učestalosti protutijela anti-HPA-1a te alela <i>HLA-DRB3*02:02</i> i učestalosti protutijela anti-HPA-5b u skupini ispitanica čija su djeca imala FNAIT.....	66
4.17.	Povezanost učestalosti protutijela anti-HPA-1a / anti-HPA-5b i protutijela anti-HLA u ispitanica.....	66
5.	RASPRAVA.....	68
5.1.	Usporedba rezultata raspodjele alela HPA s drugim populacijama...	68
5.2.	Presjek podataka nepodudarnosti u antigenima HPA u parovima majka/novorodenče te usporedba rezultata s dosadašnjim istraživanjima.....	70
5.3.	Usporedba rezultata istraživanja učestalosti i specifičnosti protutijela anti-HPA i anti-HLA u serumu ispitanica s drugim populacijama.....	71

5.4.	Osvrt na pojedine gene <i>HLA-DRB1/3/4/5</i> povezane s fetomaternalnom aloimunizacijom na antigene HPA.....	73
5.5.	Usporedba rezultata istraživanja učestalosti i specifičnosti protutijela anti-HPA i anti-HLA u serumu ispitanica čija novorođenčadi je imala FNAIT s drugim populacijama.....	74
5.6.	Osvrt na pojedine gene <i>HLA-DRB1/3/4/5</i> povezane sa specifičnim protutijelima anti-HPA u serumu ispitanica čija novorođenčadi je imala FNAIT.....	77
5.7.	Utjecaj nepodudarnosti u antigenima ABO i HPA na fetomaternalnu aloimunizaciju.....	77
5.8.	Ostali potencijalni čimbenici rizika za fetomaternalnu aloimunizaciju.....	80
6.	ZAKLJUČCI.....	83
7.	LITERATURA.....	84
8.	SAŽETAK.....	95
9.	SUMMARY.....	97
10.	PRILOZI.....	99
10.1.	Raspodjela alela gena HPA u populacijama Europe.....	99
10.2.	Raspodjela alela gena HPA u populacijama svijeta.....	100
11.	ŽIVOTOPIS.....	101

POPIS KRATICA

- APC** – antigen-predočne stanice (engl. *Antigen Presenting Cells*)
- EDTA** – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
- FMC** – fetalni mikrokimerizam (engl. *Fetal Microchimerism*)
- FNAIT** – fetalna/neonatalna aloimuna trombocitopenija (engl. *Fetal/neonatal Alloimmune Thrombocytopenia*)
- ICH** – intrakranijsko krvarenje (engl. *Intracranial Hemorrhage*)
- HDN** – hemolitička bolest novorođenčeta (engl. *Haemolytic Disease of a Newborn*)
- HLA** – humani leukocitni antigeni (engl. *Human Leukocyte Antigens*)
- HPA** – specifični trombocitni antigeni (engl. *Human Platelet Antigens*)
- ISBT** – Internacionalno društvo za transfuzijsku medicinu (engl. *International Society of Blood Transfusion*)
- LD** – visok stupanj neravnoteže udruživanja (engl. *Linkage Disequilibrium*)
- PE** – fluorokrom fikoeritrin (engl. *Phycoerythrin*)
- PCR** – metoda lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*)
- PCR-SSO** – metoda lančane reakcije polimerazom i početnicama specifičnima za pojedini alel ili skupinu alela (engl. *Sequence Specific Oligonucleotide*)
- SA-PE** – konjugat streptavidina i fikoeritrina (engl. *Streptavidin, Phycoerythrin Conjugate*)
- SNP** – polimorfizam jednog nukleotida gena (engl. *Single-Nucleotide Polymorphism*)
- TCR** – stanični receptor limfocita T (engl. *T Cell Receptor*)
- TGF- β** – receptor za transformirajući faktor rasta beta (engl. *Transforming Growth Factor beta*)
- Tregs** – regulatorni CD4⁺ limfocita T (engl. *T regulatory cells*)
- vWF** – faktor von Willebrand (engl. *von Willebrand Factor*)
- WHO** – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

1. UVOD

Na membrani trombocita nalaze se specifični trombocitni antigeni (engl. *Human Platelet Antigens*, HPA), humani leukocitni antigeni (engl. *Human Leukocyte Antigens*, HLA) i antigeni sustava ABO.

Tijekom trudnoće i poroda dolazi do miješanja krvi između majke i djeteta pa se majka može imunizirati na antigene HPA fetusa koje je dijete naslijedilo od oca. Istraživanja su pokazala da se ne imuniziraju sve majke s nepodudarnošću u antigenima HPA s djetetom^{1,2}, a razlog tome bi mogla biti niska imunogeničnost antigena HPA, kao i specifični čimbenici majčinog imunskog sustava^{3,4}. Majčini limfociti T u cirkulaciji prepoznaju tuđe antigene HPA fetusa samo ako su antigeni vezani za molekule HLA na specijaliziranim antigen-predočnim stanicama (engl. *Antigen Presenting Cell*, APC). Nakon predočavanja antigena HPA limfocitima T, oni potiču limfocite B na proizvodnju protutijela anti-HPA. Stvorena protutijela su imunoglobulini razreda IgG koji mogu proći kroz posteljicu i vezati se na trombocitne antigene HPA fetusa. Zbog vezanih protutijela može doći do razgradnje fetalnih trombocita u retikuloendotelnom sustavu slezene i jetre što uzrokuje fetalnu/neonatalnu aloimunu trombocitopeniju (engl. *Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia*, FNAIT).

1.1. ANTIGENI NA MEMBRANI TROMBOCITA

Specifični trombocitni antigeni HPA nalaze se na membrani trombocita na glikoproteinskim kompleksima GPIIb/IIIa, GPIb/IX, GPIa/IIa i CD109. Osim antigena HPA, na trombocitima se također nalaze antigeni HLA razreda I, antigeni sustava ABO, antigeni sustava Le, antigeni sustava I te antigeni sustava P. Antigeni sustava Rh te ostali antigeni krvnih grupa nisu dokazani na trombocitima.

1.1.1. Sustav HPA

1.1.1.1. Nazivlje antigena HPA

Povijesno, nazivi trombocitnih antigena temeljili su se na imenu bolesnika kod kojeg je protutijelo prvi puta opisano. Tako su, naprimjer Van Loghem i sur. u časopisu *Vox Sanguinis* 1959. godine opisali slučaj bolesnika s trombocitopenijom koja se javila nekoliko dana nakon

transfuzije pripravka pune krvi⁵. Protutijelo koje je bilo prisutno u bolesnikovom serumu nije aglutiniralo autologne (vlastite) trombocite, ali je uzrokovalo aglutinaciju alogenih trombocita (trombocita davatelja). Prema prezimenu bolesnika antigen je nazvan Zw^a. Dvije godine kasnije su Shulman i sur. opisali još dva slučaja trombocitopenije koja se također javila nakon transfuzije krvi⁶. U suradnji s Van Longhem i sur. dokazali su da protutijela bolesnika aglutiniraju Zw^a pozitivne trombocite, dok sa Zw^a negativnim trombocitima nije bilo reakcije. Antigen Zw^a tada je nazvan antigen Pl^A. Navedeni antigen je prvi serološki dokazani specifični trombocitni antigen koji se danas naziva HPA-1a. Godine 1989. su Newman i sur. identificirali polimorfizam nukleotida gena HPA (engl. *Single-Nucleotide Polymorphism*, SNP) (Tablica 1.) koji uzrokuje razliku u građi antigena HPA-1a i -1b⁷.

Nestandardizirana praksa i nepovezanost nazivlja antigena s genskim temeljem nametnula je potrebu za jedinstvenim sustavom dodjele imena HPA antigenima. Internacionalno društvo za transfuzijsku medicinu (engl. *International Society of Blood Transfusion*, ISBT) je 1990. godine definiralo nazivlje antigena HPA koji se označavaju arapskim brojevima prema redoslijedu njihovog otkrivanja. Slovo „a“ označava antigene visoke, a slovo „b“ antigene niske učestalosti. Do danas je serološkim ispitivanjem dokazan ukupno 41 specifični antigen HPA⁸. Od dokazanih antigena HPA, 12 ih je grupirano u šest bielačnih sustava (HPA-1a/b, -2a/b, -3 a/b, -4 a/b, -5 a/b i -15 a/b). Za preostalih 29 antigena HPA serološki je dokazan samo antigen niske učestalosti (b).

1.1.1.2. Genetski temelj HPA

Geni HPA imaju dva alela koja se označavaju malim slovima „a“ i „b“ prema istom principu kao i antigeni. Osim u jednom slučaju, razlika između pojedinog antigena HPA -a/b je u polimorfizmu jednog nukleotida gena HPA (engl. *Single-Nucleotide Polymorphism*, SNP) te se u molekularnoj građi antigeni HPA-a/b razlikuju samo u jednoj aminokiselini⁹. Uslijed promjene aminokiseline dolazi do promjene tercijarne strukture antigena i izražaja novog epitopa koji može uzrokovati aloimunizaciju.

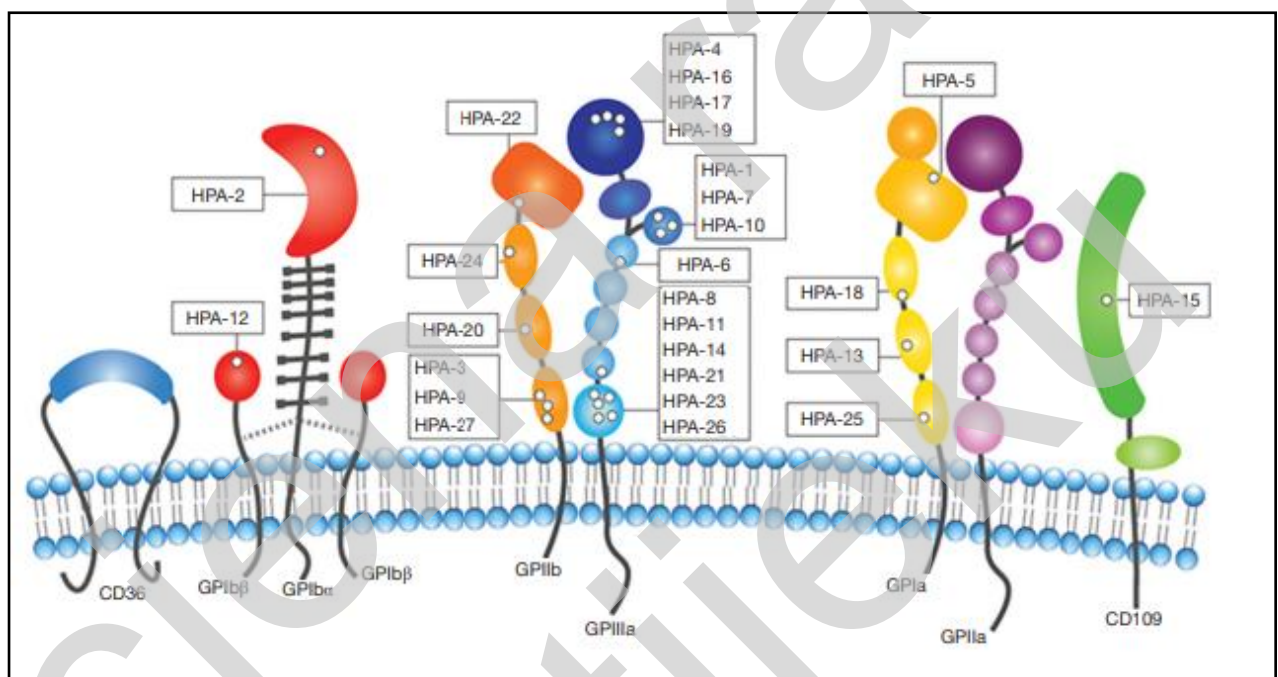
Geni za antigene HPA na pojedinim glikoproteinima nalaze se na različitim kromosomima. U Tablici 1. navedeni su do danas otkriveni sustavi i antigeni HPA, kromosom na kojem se nalazi pojedini gen HPA, glikoprotein na kojem se nalazi pojedini antigen HPA te zamjena nukleotida koja uzrokuje polimorfizam gena HPA⁸.

Tablica 1. Obilježja antigena HPA

Antigeni HPA	Kromosom	Glikoprotein	Zamjena nukleotida gena HPA
HPA-1a/b	17	GPIIIa	L33P
HPA-2a/b	17	GPIb α	T145M
HPA-3a/b	17	GPIIb	I8435
HPA-4a/b	17	GPIIIa	R143Q
HPA-5a/b	5	GPIa	E505K
HPA-6b	17	GPIIIa	R489Q
HPA-7b	17	GPIIIa	P407A
HPA-8b	17	GPIIIa	R636C
HPA-9b	17	GPIIb	V837M
HPA-10b	17	GPIIIa	R62Q
HPA-11b	17	GPIIIa	R633H
HPA-12b	22	GPIb β	G15E
HPA-13b	17	GPIIIa	K611del
HPA-14b	17	GPIIIa	K611del
HPA-15a/b	8	CD109	S682Y
HPA-16b	17	GPIIIa	T140I
HPA-17b	17	GPIIIa	T195M
HPA-18b	5	GPIa	Q716H
HPA-19b	17	GPIIIa	K137Q
HPA-20b	17	GPIIb	T619M
HPA-21b	17	GPIIIa	E628K
HPA-22b	17	GPIIb	K164T
HPA-23b	17	GPIIIa	R622W
HPA-24b	17	GPIIb	S472N
HPA-25b	5	GPIa	T1087M
HPA-26b	17	GPIIIa	K580N
HPA-27b	17	GPIIb	L841M
HPA-28b	17	GPIIb	V740L
HPA-29b	17	GPIIIa	T33M
HPA-30b	17	GPIIb	Q806H
HPA-31b	3	GPIX	P123L
HPA-32b	17	GPIIIa	N174S
HPA-33b	17	GPIIIa	D458G
HPA-34b	17	GPIIIa	R91W
HPA-35b	17	GPIIIa	R479H

1.1.1.3. Građa antigena HPA

Antigeni HPA nalaze se na šest molekula – GPIIb, GPIIIa, GPIb, GPIa, GPIIa i CD109¹⁰ koje pripadaju skupini citoadhezivnih proteina (integrina). Tradicionalno se smatraju antigenima koji se nalaze samo na trombocitima i megakariocitima. Međutim, većina antigena HPA ima širu rasprostranjenost te se nalaze i na endotelnim stanicama, fibroblastima, glatkim mišićnim stanicama i limfocitima T. Na Slici 1. shematski su prikazani glikoproteini na trombocitnoj membrani s rasporedom antigena HPA.



Slika 1. Shematski prikaz glikoproteina trombocitne membrane s rasporedom antigena HPA. Preuzeto i prilagođeno prema¹¹.

1.1.1.4. Uloga antigena HPA

Glikoproteini I Ib i IIIa na površini trombocita tvore nekovalentni kompleks ovisan o kalcijским ionima. Kompleks je prvenstveno receptor za molekule fibrinogena, a potom za fibronektin i faktor von Willebrand (engl. *von Willebrand factor*, vWF). U tijeku aktivacije trombocita dolazi do strukturne promjene kompleksa GPIIb/IIIa te se povećava afinitet za molekule fibrinogena i ostalih liganda neophodnih u procesu agregacije trombocita i stvaranja ugruška¹⁰.

Važnost kompleksa GPIIb/IIIa u hemostazi dokazana je slučajevima teških krvarenja koja se javljaju već od rane životne dobi u bolesnika s Glanzmannovom trombastenijom, poremećaju agregacije trombocita koji se nasljeđuje autosomno recesivno, a koji je uzrokovan kvantitativnim ili kvalitativnim promjenama kompleksa GPIIb/IIIa na trombocitima¹².

Na kompleksu GPIIb/IIIa nalazi se većina antigena HPA navedenih u Tablici 1. i shematski prikazanih na Slici 1. Jaka imunogeničost ovog kompleksa pripisuje se velikoj gustoći na površini trombocita s otprilike 80000 molekula GPIIb/IIIa izraženih na jednom trombocitu.

Kompleks GPIb/V/IX čine međusobno nekovalentno vezane molekule GPIb, GPV i GPIX. Na trombocitima se nalazi približno 25000 molekula ovog kompleksa na kojem su utvrđena tri specifična antigena HPA (Tablica 1., Slika 1.). Poznato je da je kompleks GPIb/V/IX receptor za molekule vWF. Mutacije gena ovog kompleksa uzrokuju gubitak funkcije cijelog receptora te su uzrok poremećaja hemostaze koji se naziva Bernard-Soulierov sindrom¹³.

Kompleks GPIa/IIa na trombocitima je glavni receptor za kolagen. Na trombocitima se nalazi približno 3000 do 5000 molekula GPIa/IIa. Na kompleksu se nalaze tri specifična antigena HPA (Tablica 1., Slika 1.)¹⁴.

Kompleks CD109 receptor je za transformirajući faktor rasta beta (engl. *Transforming Growth Factor beta*, TGF- β). Na trombocitima se nalazi oko 1000 molekula CD109¹⁰, a na samom kompleksu nalazi se antigen HPA 15a/b. Osim na trombocitima, ovaj kompleks se nalazi i na limfocitima, hematopoetskim matičnim stanicama i endotelnim stanicama.

Uz gore navedene komplekse, na trombocitima se još nalaze molekule GPIV (CD36) i GPIV. GPIV je receptor za razne ligande poput LDL-a, kolagena i trombospondina. Kompleks GPVI sudjeluje u vezanju kolagena. Na tim molekulama do danas nisu opisani specifični antigeni HPA. U populacijama azijskog i afričkog podrijetla opisane su brojne mutacije gena *CD36* koje rezultiraju promijenjenom ekspresijom kompleksa GPIV, ali bez opisanoga funkcionalnog poremećaja¹⁰.

1.1.1.5. Populacijska istraživanja gena HPA

Podatci o učestalosti pojedinih gena HPA u različitim populacijama važni su za postavljanje dijagnoze i liječenje imunih trombocitopenija.

Polimorfizam gena HPA razlikuje se u različitim populacijama u svijetu te je preraspodjela genotipova HPA geografski i etnički ograničena¹⁵⁻⁴³. Tako je, naprimjer alel *HPA-1b* učestaliji u populacijama Europe, sjeverne Afrike i Bliskog Istoka^{15,18,19} nego u populacijama Azije^{20,21}, dok je učestalost alela *HPA-2b* i *HPA-5b* visoka u populacijama Afrike^{18,22}, a vrlo niska u populacijama Azije^{21,23,24}. Alel *HPA-4b* je vrlo rijedak, uz iznimku populacije Japana²⁵ i Bahreina²⁶.

Razlike u učestalosti pojedinih alela HPA postoje i među pojedinim populacijama u Europi. Primjerice, učestalost alela *HPA-1b* je viša u populaciji Hrvatske¹⁶ i Slovenije¹⁵ od učestalosti alela *HPA-1b* u populaciji Poljske²⁷, a učestalost alela *HPA-2b* značajno je viša u populaciji Hrvatske¹⁶ i Makedonije²⁸ nego u populaciji Norveške²⁹. Također, učestalosti alela *HPA-3b* i *HPA-5b* su značajno veće u Hrvatskoj¹⁶, Srbiji¹⁷, Sloveniji¹⁵ i Makedoniji²⁸ u usporedbi sa Švicarskom (za *HPA-3b*)³⁰ i Finskom (za *HPA-5b*)³¹.

Molekularna istraživanja gena HPA u našoj populaciji vrlo su oskudna te su u do sada objavljenim radovima iznijeti samo podatci o učestalosti pojedinačnih gena *HPA-1*, *-2*, *-3*, *-5* i *-15*, bez genotipskih podataka za gene *HPA-4*, *-6*, *-7*, *-8*, *-9* i *-11*^{16,44}.

1.1.2. Sustav HLA

Antigeni sustava HLA u ljudi prvi su puta otkriveni na leukocitima te im otuda potječe i naziv humani leukocitni antigeni, HLA. Za antigene HLA u literaturi se češće koristi naziv molekule HLA⁴⁵. Na membrani trombocita nalaze se isključivo molekule HLA razreda I i to većinom HLA-A i HLA-B, dok su molekule HLA-C slabo izražene⁴⁶. Molekule HLA razreda II ne nalaze se na trombocitima⁴⁶.

Unatoč tome što se molekule HLA razreda II ne nalaze na membrani trombocita, one imaju vrlo važnu ulogu u predočavanju antigena HPA pomagačkim CD4+ limfocitima T majke što posljedično dovodi do imunološkog odgovora, odnosno stvaranja protutijela na antigene HPA te značajne trombocitopenije fetusa/novorodjenčeta⁴⁷.

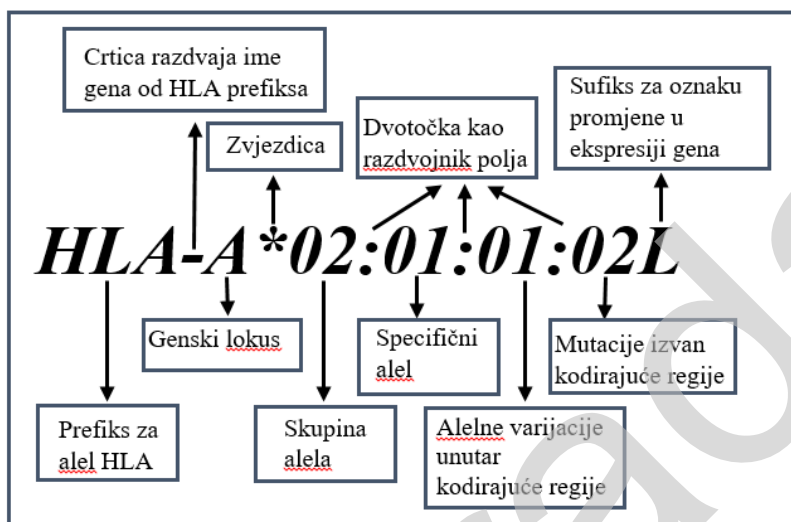
1.1.2.1. Nazivlje gena HLA

Za imenovanje gena sustava HLA odgovoran je Odbor za imenovanje gena sustava HLA (engl. *Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*) Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization, WHO*).

Svaki alel HLA ima jedinstveni broj koji se sastoji od dva do četiri skupa znamenki odvojenih dvotočkom (Slika 2.). Nomenklatura za alele HLA razlikuje se prema razredu. Za alele HLA razreda I oznaka *HLA-A* se upotrebljava da se označe genski lokusi. Zvijezdica (*) znači da je određivanje provedeno molekularnom metodom (npr. *HLA-A**). Nakon zvijezdice slijede 2 do 8 znamenki: prve dvije znamenke predstavljaju gen, odnosno skupinu alela istog gena (npr. *HLA-A*02*), a treća i četvrta znamenka se odnose na specifični alel (npr. *HLA-A*02:01*). Svi aleli s razlikom u nomenklaturi na prve četiri pozicije kodiraju proteine različitih sekvenci. Peta i šesta znamenka opisuju alelne varijacije, odnosno sinonimne mutacije unutar kodirajuće regije gena, a sedma i osma znamenka predstavljaju mutacije izvan kodirajuće regije (unutar introna ili netranslatiranih regija na 3' i 5' krajevima egzona)⁴⁸.

Nazivlje za alele HLA razreda II nije potpuno isto kao i za alele HLA razreda I. Nakon oznake *HLA* i genskog lokusa, slova "A" ili "B" predstavljaju polimorfni α i β lanac (npr. *HLA-DQA1, -DRB1, -DPB1*). Budući da neki lokusi imaju nekoliko gena za α i β lanac, svaki lokus se označava pripadajućim brojem (npr. *HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5*). Nakon zvijezdice (*) slijede 4 do 8 znamenki (npr. *HLA-DRB1*03:01*) s istim značenjem kao i kod HLA razreda I⁴⁸.

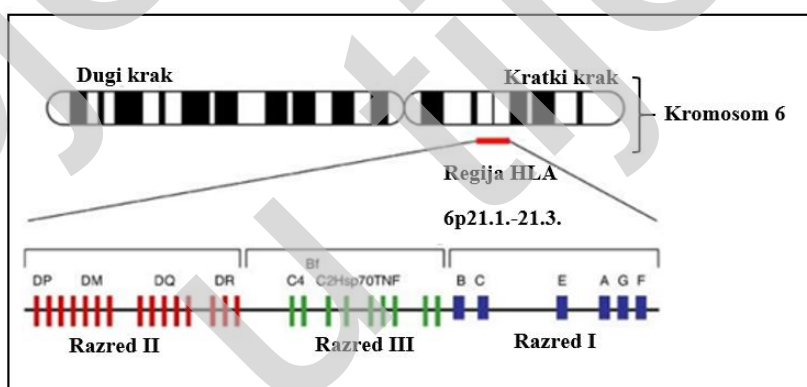
Slova predstavljaju oznake za određivanje razine ekspresije ili drugih ne-genomskih podataka koji su poznati o nekom alelu. Slovo *L* označava alel s niskom/slabom ekspresijom (engl. *low*), slovo *N* – bez ekspresije (engl. *null*), slovo *Q* – upitna ekspresija (engl. *questionable*), slovo *S* – topivi protein (engl. *soluble*) i slovo *C* – prisutan u citoplazmi (engl. *cytoplasm*).



Slika 2. Nazivlje alela HLA. Preuzeto i prilagođeno prema⁴⁹.

1.1.2.2. Nasljeđivanje gena HLA

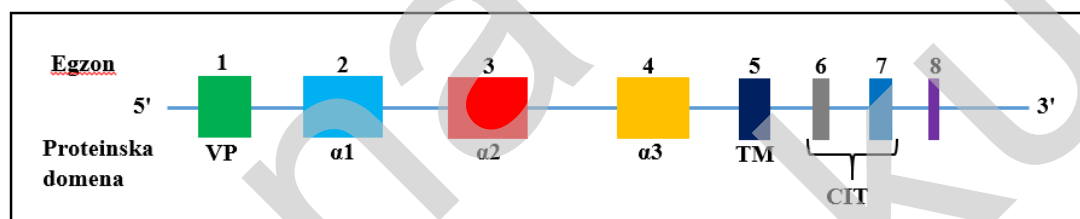
Geni HLA nasljeđuju se kodominantno, što znači da pojedinac istovremeno na svojim stanicama izražava molekule koji potječu od gena HLA naslijeđenih od oba roditelja. Regija HLA zauzima područje od približno 4 milijuna parova baza, što čini 1 % ljudskog genoma, a nalazi se na kratkom kraku kromosoma 6 u regiji 6p21.3 (Slika 3.).



Slika 3. Smještaj regije HLA na kratkom kraku kromosoma 6. Preuzeto i prilagođeno prema⁵⁰.

Regija HLA se dijeli na tri podregije: HLA razreda I, II i III⁴⁵. Podregija HLA razreda I smještena je telomerno i sastoji se od dvije skupine gena – klasičnih i neklasičnih. Skupinu klasičnih gena HLA razreda I čine geni *HLA -A*, *-B* i *-C* čiji su proizvodi molekule HLA razreda I koje su izražene na gotovo svim stanicama s jezgrom⁵¹. Količina molekula HLA

razreda I razlikuje se ovisno o vrsti stanica, najveća ekspresija je na limfocitima, dok je najmanja ekspresija na fibroblastima i hepatocitima. Pojedine stanice poput neurona i spermatozoida ne izražavaju molekule HLA razreda I⁵¹. Geni *HLA-E*, *-F* i *-G* dio su skupine neklasičnih gena HLA razreda I koji se od klasičnih razlikuju po znatno manjem polimorfizmu, ograničenoj tkivnoj rasprostranjenosti kao i specifičnoj ulozi⁵¹. Geni HLA razreda I građeni su od 8 egzona koji kodiraju teški lanac molekule HLA razreda I (Slika 4.) . Egzon 1 kodira vodeći peptid, egzon 2 podjedinicu $\alpha 1$, egzon 3 podjedinicu $\alpha 2$, a egzon 4 podjedinicu $\alpha 3$, dok egzon 5 kodira transmembransku regiju. Egzoni 6 i 7 kodiraju citoplazmatsku regiju, a završni dio molekule, netranslatirajući 3' kraj, kodira egzon 8. Egzoni gena HLA razreda I sastoje se od 1089-1101 nukleotida, a teški je lanac sastavljen od 362-366 aminokiselina. Laki lanac molekule HLA razreda I ($\beta 2$ -mikroglobulin) kodiran je genom na kromosomu 15.



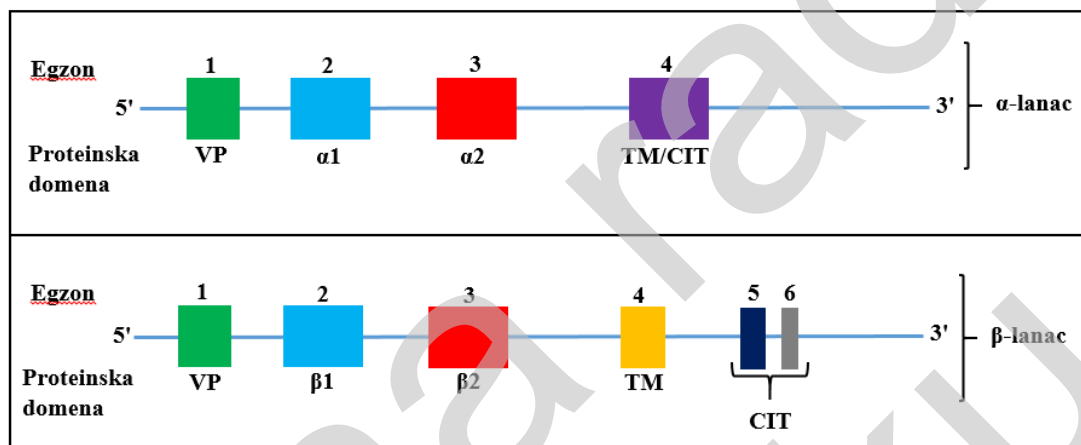
Slika 4. Organizacija gena HLA razreda I. Kratice: VP – vodeći peptid, $\alpha 1$ – podjedinica $\alpha 1$, $\alpha 2$ – podjedinica $\alpha 2$, $\alpha 3$ – podjedinica $\alpha 3$, TM – transmembranska regija; CIT – citoplazmatska regija. Preuzeto i prilagođeno prema⁴⁸.

Podregija HLA razreda II smještena je bliže centromeri i podijeljena je u 6 manjih podjedinica: *HLA-DM*, *-DN*, *-DO*, *-DP*, *-DQ* i *-DR*.

Klasični geni HLA razreda II su *HLA-DP*, *-DQ* i *-DR*. Navedeni geni kodiraju molekule HLA razreda II prisutne na membrani APC, naprimjer na makrofazima, dendritičnim stanicama, limfocitima B, monocitima, ali i na pojedinim stanicama koje imaju takvu ulogu povremeno, poput nekih endotelnih stanica te stanica timusa^{45,48}.

Preostale tri podregije čine skupinu neklasičnih gena HLA razreda II (*HLA-DM*, *-DN* i *-DO*) koji kodiraju molekule koje su prisutne uglavnom u citoplazmi stanica, ali ne i na njihovoj površini te su posredno uključene u proces funkcionalnog vezanja peptidnih ulomaka s drugim molekulama HLA razreda II.

Organizacija gena HLA razreda II slična je organizaciji gena razreda I te su različite podjedinice proteina kodirane različitim egzonima (Slika 5.)⁴⁸. Geni lanca α i β imaju sličnu strukturu, egzon 1 kodira vodeći protein, a egzoni 2 i 3 određuju dvije izvanstanične podjedinice ($\alpha 1$ i $\alpha 2$ te $\beta 1$ i $\beta 2$). Kod gena lanca β , egzon 4 određuje transmembransku regiju, a egzon 5 i 6 citoplazmatsku regiju. Kod α lanca je transmembranski i citoplazmatski kraj kodiran egzonom 4.



Slika 5. Organizacija gena HLA razreda II. Kratice: VP – vodeći peptid; $\alpha 1$ – podjedinica $\alpha 1$; $\alpha 2$ – podjedinica $\alpha 2$; $\beta 1$ – podjedinica $\beta 1$; $\beta 2$ – podjedinica $\beta 2$; TM – transmembranska regija; CIT – citoplazmatska regija. Preuzeto i prilagođeno prema⁴⁸.

Najvažnije značajke sustava HLA su veliki broj različitih gena HLA (poligenija) te njihov veliki polimorfizam⁵¹. To znači da postoje mnogobrojne varijante unutar istog gena (aleli), odnosno da svaki pojedinac posjeduje skup molekula HLA s velikim rasponom veznih mjesta za različite peptide.

Specifična kombinacija alela HLA nađen na jednom kromosomu 6 naziva se haplotip HLA, a nasljeđuje se kodominantno, po jedan haplotip od svakog roditelja.

Jedna od osobitosti sustava HLA je visok stupanj neravnoteže udruživanja (engl. *Linkage Disequilibrium*, LD) zbog koje se različiti aleli dva ili više bliskih lokusa HLA javljaju češće u istom haplotipu HLA, nego što je to očekivano na temelju njihovih pojedinačnih učestalosti^{48,52,53}.

1.1.2.3. Građa molekula HLA razreda I i II

Molekule HLA razreda I građene su od dva polipeptidna lanca – teškog α -lanca koji se sastoji od podjedinice α_1 , α_2 i α_3 te lakog β -lanca, tzv. β_2 -mikroglobulina koji je nekovalentno vezan uz α -lanac (Slika 6.)⁵¹.

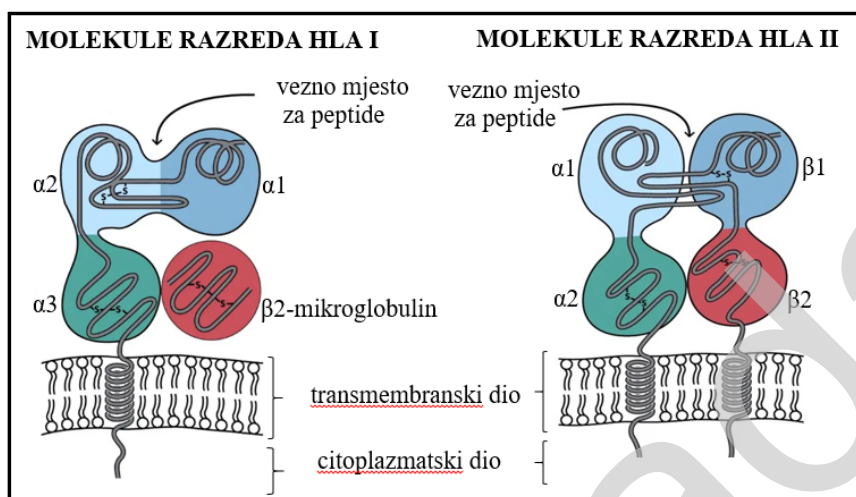
Najvažniji dio molekule HLA razreda I je onaj koji veže peptid. Taj dio se sastoji od 180 aminokiselina stereokemijski podijeljenih u dijelove α_1 i α_2 koji zajedno tvore pukotinu (vezno mjesto) u koju se smješta prerađeni peptidni ulomak. Pukotina je veličine 2,5x1,0x1,1 nm te može vezati antigenski ulomak od 9-11 aminokiselina. Tu pukotinu okružuju upravo one aminokiseline koje se razlikuju u molekulama HLA razreda I što ih određuju geni HLA razreda I. Drugim riječima, polimorfizam gena HLA služi za stvaranje različitosti stereokemijske površine pukotina koje vežu peptidne ulomke. Ostatak aminokiselina tvori dio molekule oko pukotine, koji zajedno s peptidnim ulomkom prepoznaje stanični receptor (engl. *T Cell Receptor*, TCR) limfocita T⁴⁸. Najpolimorfiji dio molekule HLA razreda I je upravo vezna pukotina za peptidni ulomak te mjesto interakcije molekule HLA s TCR citotoksičnih CD8 limfocita T.

Pojedina molekula HLA sadrži samo jedno mjesto za vezanje peptidnog ulomka. Međutim, peptidi koji se vežu na istu molekulu HLA ne moraju biti potpuno istovjetni.

Podjedinica α_3 je dio molekule HLA koji je po građi sličan imunoglobulinima te sadrži vezno mjesto za molekulu CD8 na citotoksičnim CD8+ limfocitima T.

Uz navedene tri izvanstanične podjedinice (α_1 , α_2 i α_3), teški α -lanac također ima i transmembransku i citoplazmatsku regiju. Transmembranska hidrofobna regija prolazi kroz membranu stanice, a citoplazmatska hidrofilna regija sidri molekulu HLA razreda I u membrani stanice⁴⁵.

Sve molekule HLA razreda I imaju građom identičan β -lanac koji ima ulogu u izražavanju molekule HLA razreda I na staničnoj površini. Građa molekula HLA razreda I prikazana je na Slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz građe molekula HLA razreda I i II na membrani stanice. Preuzeto i prilagođeno prema⁵¹.

Molekule HLA razreda II također su heterodimeri građeni od dva homogena, nekovalentno vezana polipeptidna lanca, nešto većeg α lanca građenog od podjedinice $\alpha 1$ i $\alpha 2$ te β lanca građenog od podjedinice $\beta 1$ i $\beta 2$. U načelu su nalik molekulama HLA razreda I pa jednako tako imaju dio koji veže peptid, dio koji slični imunoglobulinu te transmembransku i citoplazmatsku regiju.

Podjedinice $\alpha 1$ i $\beta 1$ tvore vezno mjesto (pukotinu) za peptidne ulomke. Za razliku od veznog mjesta molekule HLA razreda I, ovdje su krajevi pukotine otvoreni tako da vezani peptidni ulomak može stršati izvan pukotine te stoga molekule HLA razreda II mogu u pukotinu vezati veće peptide od 10 do 30 aminokiselina⁴⁵.

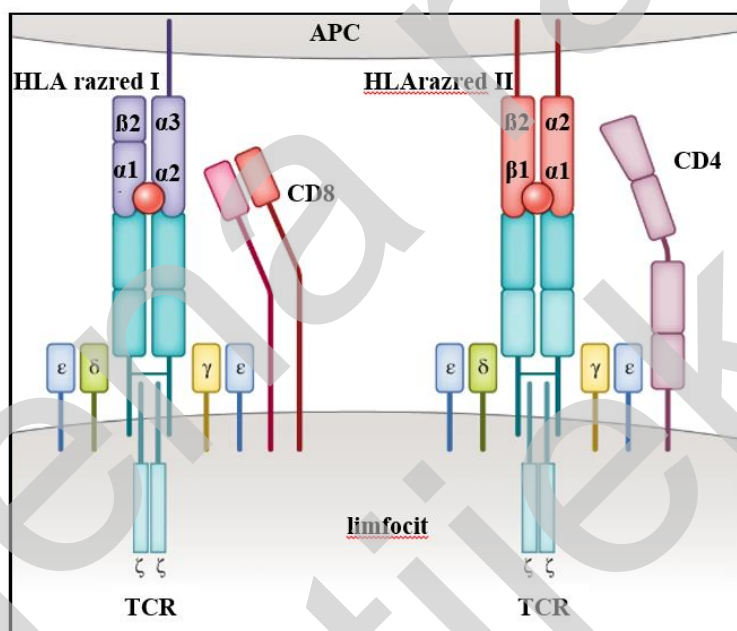
Podjedinice $\alpha 2$ i $\beta 2$ su važne za nekovalentno povezivanje lanaca α i β . Podjedinica $\beta 2$ sadrži vezno mjesto za molekulu CD4 na pomagačkim CD4+ limfocitima T⁴⁵.

1.1.2.4. Uloga molekula HLA

Molekule HLA glavni su dio antigen-predočnog sustava na površini stanica te predočuju vlastite i strane peptidne ulomke pomagačkim CD4+ i citotoksičnim CD8+ limfocitima T.

Glavna uloga molekula razreda I je predočavanje prerađenih unutarstaničnih bjelančevina – naprimjer virusnih peptida, peptidnih dijelova drugih unutarstaničnih patogena, razgradnih dijelova tumorskih proteina, bjelančevina oštećenih u staničnom stresu ili pogrešno sintetiziranih te starijih bjelančevina koji su na kraju svog staničnog ciklusa – citotoksičnim CD8+ limfocitima T⁴⁵.

Nakon što se unutarstanične bjelančevine u lizosomima razgrade i skrate na prikladnu veličinu, peptidni ulomci ulaze u pukotinu molekule HLA razreda I te se kompleks molekule HLA razreda I i peptida u egzocitotskom mjehuriću prenosi na površinu stanice. Dio oko pukotine, odnosno dio podjedinice $\alpha 1$ i $\alpha 2$, zajedno sa stranim antigenom prepoznaje TCR citotoksičnih $CD8^+$ limfocita T^{45,48}. Treći dio lanca α služi kao vezno mjesto za molekulu citotoksičnih $CD8^+$ limfocita T (Slika 7.). Iz navedenoga je jasno da molekule HLA razreda I predočuju antigene citotoksičnim $CD8^+$ limfocitima T mehanizmom tzv. spregnutog prepoznavanja gdje se TCR limfocita T moraju određenim afinitetom vezati kako za peptid, tako i za dijelove molekule HLA razreda I⁴⁸.



Slika 7. Shematski prikaz građe TCR pomagačkih $CD4^+$ i citotoksičnih $CD8^+$ limfocita T. Kratice: APC – antigen predajuće stanice; TCR – receptor limfocita T; $CD8$ – molekula $CD8^+$ limfocita T; $CD4$ – molekula pomagačkih $CD4^+$ limfocita T. Preuzeto i prilagođeno prema⁵⁴.

Molekule HLA razreda II predočuju prerađene izvanstanične molekule (antigene). Izvanstanični proteini prvo budu fagocitirani i prerađeni u lizosomima stanice u manje peptidne ulomke, a potom ih molekule HLA razreda II predočuju pomagačkim $CD4^+$ limfocitima T. Na taj način pomagački $CD4^+$ limfociti T povezani s molekulama HLA razreda II mogu prepoznati antigene na ograničenom broju stanica i predočavati peptide koji su nastali od izvanstaničnih mikroorganizama. Vrlo je važno da se peptidni ulomak čvrsto veže u pukotinu molekule kako ne bi došlo do odvajanja i razgradnje peptidnog ulomka.

Pomagački CD4+ limfociti T tada aktiviraju makrofage ili potiču limfocite B na stvaranje antigen-specifičnih protutijela.

Molekule kodirane nekласičnim genima HLA razreda II (*HLA-DM*, *-DN*, *DO*) prisutne su uglavnom u citoplazmi stanica i samo su posredno uključene u proces vezanja peptidnog ulomka s drugim molekulama HLA razreda II.

1.1.3. Sustav ABO

1.1.3.1. Nazivlje antigena sustava ABO

Prema ISBT i radnoj skupini za imunogenetiku i terminologiju sustava krvnih grupa (engl. *Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology Working Party*) do danas je identificirano ukupno 45 sustava krvnih grupa u koje je svrstano 360 eritrocitnih antigena⁵⁵.

Sustav ABO smatra se klinički najznačajnijim sustavom krvnih grupa, a prvi ga je opisao još davne 1901. godine Karl Landsteiner⁵⁶, liječnik iz Austrije koji je za svoje otkriće dobio Nobelovu nagradu 1930. godine.

Antigena specifičnost membrane eritrocita ovisi o prekursorima antigena A i B odnosno antigenima H koji spadaju u sustav Hh⁵⁷. Antigen H je po građi ugljikohidratni lanac, a antigeni A i B u osoba krvne grupe A, B ili AB nastaju terminalnim dodavanjem jednostavnih ugljikohidrata na antigen H. Kod osoba krvne grupe O antigen H ostaje nepromjenjen.

U iznimno rijetkim slučajevima u osobe se može javiti alelna varijanta (alel *h*) koja je izgubila mogućnost kodiranja enzima za stvaranje antigena H. U tih osoba antigen H nije prisutan te se takav fenotip naziva *Bombay*, prema gradu Bombayu u Indiji gdje je prvi puta otkriven, a pojavljuje se u otprilike 1:10000 osoba u Indiji te u otprilike 1:1000000 osoba u Europi⁵⁸.

Osobe krvne grupe O imaju na membrani stanica samo antigene H, dok osobe krvne grupe A, B ili AB imaju na membrani stanica manji broj antigena H te antigene A, B ili AB, kako slijedi. U osoba fenotipa *Bombay* na membrani eritrocita ne nalazi se niti jedan od navedenih antigena.

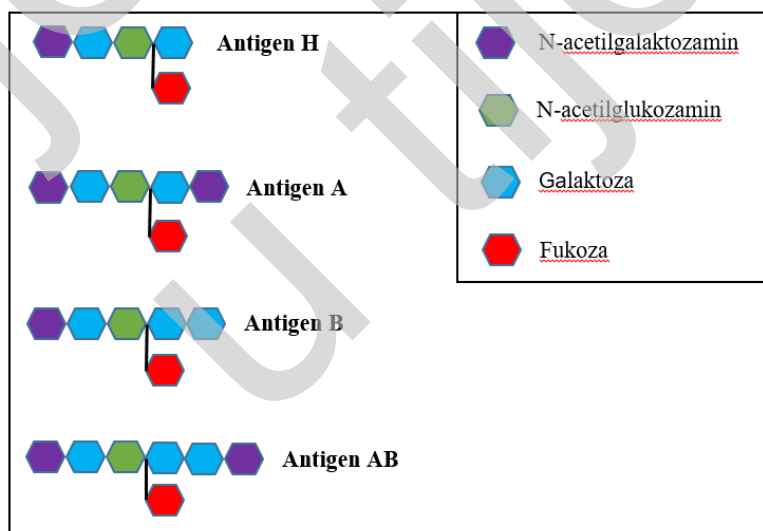
1.1.3.2. Nasljeđivanje gena sustava ABO

Gen koji kodira antigen H nalazi se na kromosomu 19. Lokus *H* ima dva alela: *H* i *h*, od kojih je alel *H* dominantan, s visokom učestalošću u populaciji (više od 99,99 %) ⁵⁸.

Geni sustava ABO nalaze se na kromosomu 9 i imaju tri alela: *A*, *B* i *O*. Dijete nasljeđuje dva gena *ABO*, svaki od jednog roditelja. Aleli *A* i *B* su autosomno kodominantni, dok je alel *O* recesivan. Proteinski proizvod ekspresije alela *A* je enzim A glikoziltransferaza (GTA) koji katalizira prijenos N-acetilgalaktozamina na antigen H, pri čemu dolazi do stvaranja antigena A na stanicama. Alel *B* se razlikuje u samo 4 aminokiseline od alela *A* te kodira enzim B glikoziltransferazu (GTB) koji prenosi D-galaktozu na antigen H, pri čemu dolazi do stvaranja antigena B. Alel *O* smatra se nefunkcionalnim, s obzirom na to da je genski proizvod alela *O* enzimski inaktivan protein te takve osobe nemaju prisutan antigen A/B na membrani stanica. Nadalje, određeni polimorfizmi gena *ABO* rezultiraju prisutnošću oba enzima. U tih osoba dolazi do stvaranja oba antigena odnosno do prisutnosti zajedničkog epitopa AB.

1.1.3.3. Građa i razvoj antigena sustava ABO

Antigeni sustava ABO po građi su ugljikohidratni lanci. Na antigen A je na kraju ugljikohidratnog lanca vezan monosaharid N-acetil-galaktozamin, a na antigen B D-galaktoza. Široko su zastupljeni u prirodi, a u ljudskom se organizmu nalaze na eritrocitima, limfocitima, trombocitima, stanicama različitih tkiva, stanicama koštane srži i organima, naprimjer na stanicama bubrega, jetre itd. Građa antigena sustava ABO prikazana je na Slici 8.



Slika 8. Shematski prikaz građe antigena sustava ABO

Antigeni sustava ABO se stvaraju već od petog do šestog tjedna *in utero*. Novorođenče, za razliku od odrasle osobe, posjeduje manji broj antigena ABO na stanicama. Kompletna ekspresija antigena se javlja od druge do četvrte godine starosti.

Na trombocitima su antigeni sustava ABO vezani na glikoprotein GPIIb ili na trombocitne adhezijske molekule (PECAM-1, CD31). U nekoliko se istraživanja navodi da se ekspresija antigena A i B na trombocitima razlikuje od osobe do osobe te da od 4-7 % osoba ima pojačanu ekspresiju ABO antigena na trombocitima odnosno čak do 20 puta veću koncentraciju antigena na trombocitima od prosjeka⁵⁹.

1.1.3.4. Uloga antigena ABO

Klinička je značajnost, odnosno imunogeničnost antigena ABO dobro poznata. Prirodna protutijela anti-ABO koja su prisutna u osoba krvne grupe A, B i O mogu uzrokovati brojne imunološke reakcije, naprimjer akutnu hemolitičku transfuzijsku reakciju (engl. *Acute Haemolytic Transfusion Reaction*, AHTR), hemolitičku bolest novorođenčeta (engl. *Haemolytic Disease of a Newborn*, HDN), reakciju odbacivanja presadka (engl. *Antibody-Mediated Rejection*, ABMR) itd.⁶⁰

Učestalost antigena ABO razlikuje se između populacija te oni čine evolucijsku prednost pojedine populacije, naprimjer osiguravaju otpornost na neke zarazne bolesti.

Povezanost polimorfizma gena ABO i pojedinih bolesti poput karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, tromboembolijskih incidenata, hematoloških poremećaja, metaboličkih bolesti, kognitivnih poremećaja, infekcija i sl., dokazana je u brojnim istraživanjima⁶¹⁻⁶⁸.

S obzirom na to da sudjeluju u procesima staničnog prepoznavanja te u adheziji stanica, antigeni ABO imaju ulogu u karcinogenezi⁶⁸. Također je dokazano da pojedine karcinomske stanice na svojoj površini izražavaju antigene ABO. Važno je naglasiti da, iako postoji povezanost krvne grupe ABO s pojedinim karcinomima, to ne znači da uzrokuju karcinome već da samo povećavaju rizik od istih. Tako je, naprimjer, dokazano da je pojava karcinoma želuca češća u osoba krvne grupe O⁶², dok se u osoba krvne grupe A uz karcinom želuca često dijagnosticiraju i karcinomi jajnika, žlijezda slinovnica, grlića maternice te debelog crijeva⁶¹. Dobro je poznata i uloga antigena ABO u pojavi hematoloških bolesti. Primjerice, učestalost limfoma Hodgkin i non-Hodgkin veća je u osoba krvne grupe B; akutna limfoblastična leukemija (engl. *Acute Lymphoblastic Leukemia*, ALL) učestalija je u osoba krvne grupe O, dok se akutna mijeloična leukemija (engl. *Acute Myeloid Leukemia*, AML) češće javlja u

osoba krvne grupe A⁶¹. Nadalje, bolesnici s leukemijom i aplastičnom anemijom imaju do 37 % manji izražaj antigena A i B na eritrocitima u usporedbi sa zdravim osobama⁶³.

Također je dokazano da osobe krvne grupe O u plazmi imaju oko 25 % nižu koncentraciju čimbenika zgrušavanja – faktora VIII i vWF. Ova činjenica objašnjava etiologiju arterijskih i venskih tromboembolija koje se u osoba navedene krvne grupe javljaju rjeđe nego u osoba ostalih krvnih grupa ABO⁶⁴. Pojava demencije i kognitivnog oštećenja povezuje se s višom koncentracijom faktora VIII dokazanom u osoba krvne grupe AB⁶⁵.

Antigeni ABO na površini stanica služe kao receptori za bakterije, viruse i parazite te stoga polimorfizam gena ABO utječe na učinkovitost vezanja pojedinih patogena na stanice domaćina⁶⁶. U prošlosti je, uslijed mnogobrojnih epidemija, dokazano da osobe krvne grupe O učestalije oboljevaju od kolere, kuge, tuberkuloze i zaušnjaka, dok je u osoba krvne grupe A učestalija pojava ospica i infekcija bakterijom roda *Pseudomonas aeruginosa*⁶⁷. U osoba krvne grupe B učestalija je pojava gonoreje, tuberkuloze, infekcija bakterijama *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli* i *Salmonela enteritidis*, dok je u osoba krvne grupe AB češća pojava ospica te infekcija bakterijama *E. coli* i *Salmonela enteritidis*⁶⁷. Također je važno naglasiti da brojni patogeni imaju iste antigene ABO koje nalazimo u ljudi. Primjerice, antigen A dokazan je u virusu ospica te se time objašnjava otpornost osoba krvne grupe B i O (koje imaju prirodna protutijela anti-A) na virus ospica.

1.2. FETOMATERNALNA ALOIMUNIZACIJA NA ANTIGENE HPA

1.2.1. Definicija i patofiziologija fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA

Antitrombocitna protutijela mogu se stvoriti u tijeku trudnoće i poroda ukoliko postoji nepodudarnost u antigenima HPA majke i fetusa. Poznato je da tijekom trudnoće, a posebno tijekom poroda, dolazi do miješanja krvi između majke i djeteta. Zbog miješanja krvi između majke i fetusa, odnosno pojave antigena HPA fetusa u cirkulaciji majke, nakon razgradnje u lizosomima peptidni ulomci antigena HPA fetusa budu predočeni APC pomagačkim CD4⁺ limfocitima T. Pojedini antigeni HPA fetusa vrlo se čvrsto vežu u pukotinu molekule HLA koja je prisutna na APC-u majke. Na taj način APC učinkovito predočuju antigene HPA fetusa limfocitima T majke, što dovodi do aktivacije limfocita B te proizvodnje protutijela. Stvorena su protutijela imunoglobulini razreda IgG te mogu prijeći kroz posteljicu i vezati se na trombocite fetusa. Zbog vezanih protutijela IgG može doći do razgradnje fetalnih trombocita u retikuloendotelnom sustavu slezene i jetre te fetalne trombocitopenije s brojem trombocita manjim od $150 \times 10^9/L$. Zbog visokog afiniteta vezanja antigena HPA fetusa u pukotinu molekule HLA majke te učinkovitog predočavanja antigena HPA imunom sustavu majke, dolazi do stvaranja velike količine (titra) protutijela anti-HPA⁶⁹ te do značajne trombocitopenije fetusa/novorodenčeta⁷⁰. Primjer takvog visokog afiniteta vezanja su antigeni HPA-1a fetusa i molekule HLA kodirane alelom *HLA-DRB3*01:01*⁴, pri čemu dolazi do stvaranja protutijela na antigen HPA-1a u vrlo visokom titru te do značajne trombocitopenije djeteta.

Majčina protutijela mogu od 14. gestacijskog tjedna prijeći u posteljicu, a titar protutijela raste kako trudnoća napreduje te je najviši u zadnjem trimestru trudnoće. Antigeni HPA na trombocitima fetusa potpuno su razvijeni već u 16. gestacijskom tjednu⁷¹, stoga je rizik od razvoja imunološke razgradnje trombocita prisutan već od drugog trimestra trudnoće.

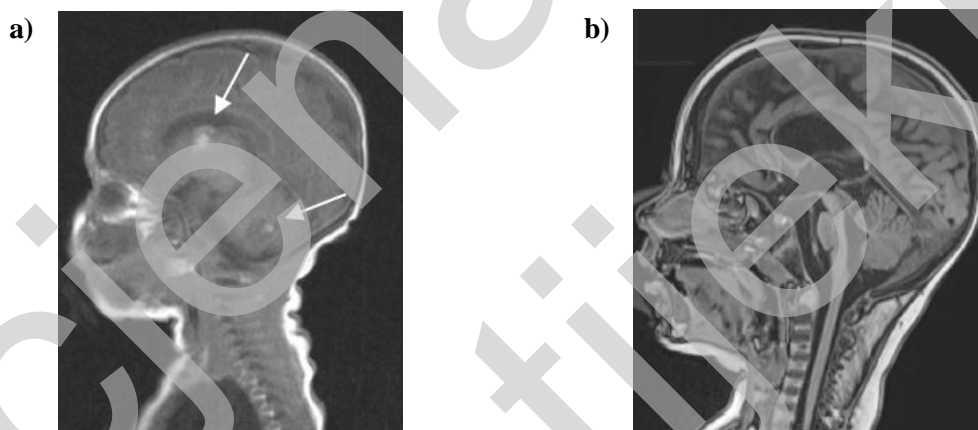
1.2.2. Fetalna/neonatalna aloimuna trombocitopenija (FNAIT)

Pad broja trombocita fetusa/novorodenčeta ($trc < 150 \times 10^9/L$) koji nastaje uslijed imunosne razgradnje fetalnih trombocita naziva se fetalna/neonatalna aloimuna trombocitopenija (FNAIT). U zdrave, donesene novorođenčadi FNAIT je najčešći uzrok izolirane trombocitopenije.

Klinički sindrom je sličan hemolitičkoj bolesti novorođenčeta, iako se FNAIT, za razliku od HDN-a, može javiti već u prvoj trudnoći.

Iako je učestalost FNAIT-a niska te se procjenjuje na 1:1000-2000 trudnoća⁷², trombocitopenija je potencijalno vrlo opasno stanje zbog mogućih spontanih krvarenja koja se mogu javiti kao posljedica sniženog broja trombocita.

Trombocitopenije novorođenčadi većinom prolaze asimptomatski, ali se u oko 20 % slučajeva mogu javiti petehije, ehimoze ili purpura. Krvarenja u kožu se u najvećem broju slučajeva javljaju kada je broj trombocita manji od $30 \times 10^9/L$ ⁷³. U težim slučajevima mogu se javiti ozbiljna krvarenja poput gastrointestinalnog krvarenja ili hematurije, a u najozbiljnijim slučajevima i intrakranijska krvarenja (engl. *Intracranial Hemorrhage*, ICH) (Slika 9.)^{74,75}. Često se javljaju već antenatalno te mogu uzrokovati trajne neurološke posljedice novorođenčeta^{74,76}. Ukoliko se ne provede antenatalna terapija, mortalitet novorođenčadi procjenjuje se na oko 1 %⁷³.



Slika 9. Magnetska rezonanca mozga, preuzeto i prilagođeno prema ⁷⁶.

a) ICH u velikom mozgu i cerebelumu djeteta s FNAIT-om (strelice)

b) Dugoročne posljedice ICH-a: redukcija bijele tvari, ventrikulomegalija, leukomalacija i atrofija mozga

Moguće je da se FNAIT pojavi već u prvoj trudnoći, a svaka sljedeća trudnoća u kojoj postoji nepodudarnost u specifičnom antigenu HPA između majke i djeteta u pravilu je s izraženijom trombocitopenijom i ozbiljnijom kliničkom slikom⁷⁷.

1.2.3. Učestalost i specifičnost protutijela na antigene HPA

Iako se već od 1953. godine mogu naći radovi o niskom broju trombocita u novorođenčadi⁷⁸, tek je desetak godina kasnije utvrđeno da su majčina protutijela anti-HPA jedan od mogućih uzroka novorođenačke trombocitopenije⁶. Dosadašnja istraživanja pokazuju da je više od 95 % serološki potvrđenih trombocitopenija novorođenčadi uzrokovano fetomaternalnom aloimunizacijom na jedan od pet antigenskih sustava: HPA-1, -2, -3, -5 i -15^{72,74,79}. U dosad najvećem objavljenom istraživanju (N=1162) nađena je učestalost protutijela na antigen HPA-1a od 79 %⁷². Učestalost protutijela anti-HPA-5b, -1b i -15b procjenjuje se na 2 do 36 %^{72,74}, dok se protutijela anti-HPA-3a i -9b javljaju u približno 2 do 3 % slučajeva^{72,74}. Prisutnost protutijela anti-HPA-2a, -2b, -3b, -4a, -4b, -5a, -6b, -7b i -8b procjenjuje se na oko 1 %^{72,74}.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da se osobe s mutacijom gena *CD36* i nedostatkom kompleksa GPIV mogu imunizirati na taj kompleks te su opisani FNAIT-i uzrokovani protutijelima na kompleks GPIV (*CD36*)⁸⁰. Mutacije gena *CD36* češće su u populacijama Azije (3-11 %) i Afrike (7-8 %) nego u populacijama Europe (< 0,3 %)⁸¹. Protutijela usmjerena na kompleks GPIV zbog vezanja na fetalne eritroblaste, koji na membrani slično kao i fetalni trombociti sadrže antigene *CD36*, mogu uz FNAIT uzrokovati tešku anoksičnu anemiju te fetalni hidrops⁸².

Za razliku od protutijela na kompleks GPIV, slučajevi FNAIT-a uzrokovani protutijelima na kompleks GPIV do danas nisu opisani u literaturi.

S obzirom na to da su u dosadašnjim istraživanjima u populacijama sjeverne Europe i Bliskog Istoka protutijela na antigen HPA-1a najčešća i klinički najznačajnija, većina antenatalnih istraživanja bila je usmjerena na pretraživanje antitrombocitnih protutijela u trudnica koje su homozigoti *HPA-1bb*⁸³. Broj istraživanja koja se bave antenatalnom analizom učestalosti ostalih protutijela (anti-HPA-1 do HPA-5) vrlo je oskudan.

Rezultati retrospektivnog istraživanja iz Njemačke pokazali su da je učestalost fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA 4,2 %, a najčešće uočeno protutijelo bilo je na antigen HPA-5b, a potom protutijelo na antigen HPA-1a⁸⁴. Istraživanje iz 2007. godine provedeno u Brazilu objavilo je podatak o učestalosti nepodudarnosti u parovima majka/novorođenče u antigenima HPA-1 do HPA-5 od približno 50 %, dok je uočena učestalost protutijela anti-HPA majki bila samo 0,05 %¹. Sva otkrivena protutijela bila su na antigen HPA-5b, kao i u istraživanju iz 2017. godine grupe autora iz Švicarske koji su dokazali učestalost nepodudarnosti parova

majka/novorodjenče od 45 %, dok je uočena učestalost fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA bila 2 %².

Protutijela anti-HLA razreda I mogu se dokazati u serumima trudnica i roditelja u 33-54 % slučajeva^{85,86}. Mason i sur. su u Francuskoj objavili istraživanje o učestalosti protutijela anti-HLA u osoba koje su primile transfuziju krvi⁸⁶. Za razliku od vrlo niske učestalosti aloimunizacije u muškaraca (1,3 %) i žena koje nisu rodile (0 %), dokazana je visoka učestalost protutijela anti-HLA u žena koje su rodile jedno ili više djece (31 %)⁸⁶.

U istraživanju Clippel i sur. provedenom u Belgiji uočena je učestalost protutijela anti-HLA od 31 % u žena koje su rodile⁸⁵. Učestalost fetomaternalne aloimunizacije bila je nešto viša u žena koje su rodile više djece (33 %) te značajno viša u žena koje su imale djecu s više partnera (40 %). Objavljeni podaci ukazali su na statistički značajnu povezanost fetomaternalne aloimunizacije na antigene HLA i broja trudnoća.

Protutijela anti-HLA razreda I mogu uzrokovati FNAIT istim imunskim mehanizmom kao i protutijela anti-HPA, iako se to događa iznimno rijetko. Taaning i sur. i Panzer i sur. su pregledom i analizom dostupne literature pokazali da su dokazi o FNAIT-u uzrokovanom protutijelima anti-HLA razreda I vrlo slabi, odnosno da u velikoj većini objavljenih slučajeva nisu zadovoljeni uvjeti za dijagnozu FNAIT-a^{87,88}.

Za razliku od protutijela anti-HPA i anti-HLA koja se stvaraju samo nakon transfuzije krvi, transplantacije hematopoetskih matičnih stanica ili solidnih organa, ili tijekom trudnoće, protutijela anti-A i anti-B su prirodna protutijela koja se javljaju u svih osoba već od 4. mjeseca života kada imunski sustav dođe u kontakt s tuđim antigenima prisutnima u hrani i na mikroorganizmima. Naime, ugljikohidratna struktura antigena koji se nalaze u prirodi vrlo je slična strukturi antigena sustava ABO. Imunski sustav osobe stvara protutijela na one antigene koje ne posjeduje pa tako osobe krvne grupe A u serumu imaju protutijela anti-B, osobe krvne grupe B protutijela anti-A, dok osobe krvne grupe O imaju protutijela anti-A i anti-B. Jedino u osoba krvne grupe AB protutijela nisu prisutna. Protutijela anti-A i anti-B, slično kao i protutijela anti-HLA razreda I, rijetko su uzrok FNAIT-a. To se događa najčešće u slučajevima kada novorođenče ima pojačanu ekspresiju antigena A/B na trombocitima⁸⁹.

U istraživanju Tiller i sur. navodi se da, u slučaju kada se pretraživanje na antitrombocitna protutijela provodi samo kod već prisutnih kliničkih znakova FNAIT-a, 86 % slučajeva FNAIT-a ostaje nedijagnosticiran⁹⁰.

U Hrvatskoj, kao i u većini drugih zemalja, pretraživanje protutijela anti-HPA nije dio standardne zdravstvene zaštite trudnica. Trudnoće se smatraju rizičnim samo ukoliko postoji anamnestički podatak o FNAIT-u u prethodnog djeteta. Stoga podaci o učestalosti

fetomaternalne aloimunizacije na antigene sustava HPA, učestalosti nepodudarnosti u antigenima sustava HPA te povezanosti fetomaternalne aloimunizacije s genima *HLA-DRB1/3/4/5* i nepodudarnosti u antigenima sustava ABO nisu poznati.

Ocjena rada
u tisku

2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja bili su sljedeći:

1. Svim majkama odrediti alele i genotipove *HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -11 i -15*, kao i cjelokupni genotip HPA.
2. Svoj novorođenčadi odrediti alele gena *HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -11 i -15*.
3. Analizirati broj i specifičnost nepodudarnosti u antigenima sustava HPA i ABO u parovima majka/novorođenče.
4. Svim majkama odrediti prisutnost protutijela anti-HPA i odrediti njihovu specifičnost.
5. Majkama s dokazanom nepodudarnošću u antigenima HPA s novorođenčetom i majkama s dokazanim protutijelima anti-HPA odrediti gene *HLA-DRB1/3/4/5*.
6. U skupini majki čija su djeca razvila trombocitopeniju i već su dijagnostički obrađena u Kliničkom bolničkom centru Zagreb u razdoblju od 2013. do 2022. godine analizirati podatke dijagnostičke obrade. Podatci će uključivati specifičnost protutijela anti-HPA, gene HPA majke i novorođenčeta te gene *HLA-DRB1/3/4/5* majke.
7. Analizirati povezanost nepodudarnosti u antigenima sustava ABO i aloimunizacije na antigene HPA.

Hipoteza istraživanja bila je:

Fetomaternalna aloimunizacija na antigene HPA-1, -2, -3, -4 i -5 u majki koje su rodile dijete nepodudarno u antigenima HPA povezana je s genima *HLA-DRB1/3/4/5* i s nepodudarnošću u antigenima sustava ABO. Također, polimorfizam gena *HLA-DRB1/3/4/5* povezan je s fetomaternalnom aloimunizacijom na pojedini specifični antigen HPA.

3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Zagreb. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC-a Zagreb (klasa 8.1-18/98-2, broj 02/21 AG), u Zagrebu, 24. travnja 2018. godine.

3.1. Ispitanici i prikupljanje uzoraka

U istraživanje su uključene dvije skupine žena. Skupina jedan bila je uključena u populacijski dio istraživanja o raznovrsnosti gena HPA u Hrvatskoj. Tim dijelom istraživanja bile su obuhvaćene ispitanice koje su odlučile pohraniti krv iz pupkovine u Banku krvi iz pupkovine u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju KBC-a Zagreb, u dobi od 18 do 50 godina. Sve ispitanice potpisale su informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Rodile su spontano ili carskim rezom novorođenče gestacijske dobi > 37 tjedana. Za istraživanje gena HPA, ispitivanje protutijela anti-HPA te za određivanje antigena sustava ABO koristili su se uzorci majki uzeti neposredno nakon poroda, a za istraživanje gena HPA i određivanje antigena sustava ABO u novorođenčadi uzorci krvi iz pupkovine uzeti u postupku prikupljanja. Za uočavanje razlika u proporcijama, minimalna veličina uzorka uz snagu 0,80 je ukupno 384 ispitanika – 192 majke i 192 novorođenčeta (G*Power verzija 3.0.10). Za izračun se koristila iz literature poznata učestalost protutijela anti-HPA u žena koje su rodile od 4,2 %⁸⁴.

Ispitivana skupina dva obuhvaćala je majke novorođenčadi (N=22) u kojih je u razdoblju od 2013. do 2023. godine u KBC Zagreb serološki dokazan FNAIT. Zamrznuta DNA majki i novorođenčadi koja se koristila u dijagnostičkoj obradi FNAIT-a čuva se trajno i do testiranja je bila pohranjena na -80 °C .

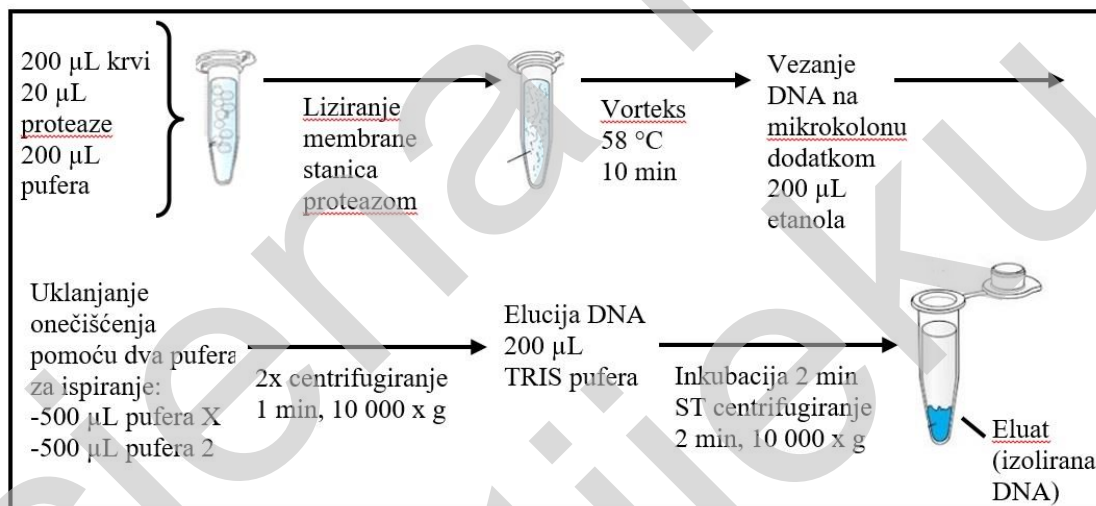
3.2. Metode

3.2.1. Izolacija DNA majke i novorođenčeta

Iz uzoraka pune krvi majke (200 µL) i uzoraka krvi iz pupkovine (200 µL) uzetih u epruvete s etilendiamintetraoctenom kiselinom (engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*, EDTA) izolirana

je DNA komercijalnim setom za izolaciju (Ready DNA Spin Kit, Inno-train, Kronberg im Taunus, Njemačka).

Metoda izolacije DNA temeljila se na svojstvu DNA da se adsorbira na silikatnu membranu (Slika 10.). Stanice su lizirane inkubacijom uzorka pune krvi s puferom za razgradnju stanica i proteazom. U sljedećem je koraku lizatu koji sadrži DNA dodan etanol te je uzorak prebačen na kolonu za centrifugiranje (spin kolona). Potom je DNA adsorbirana na površinu silicijske membrane, dok su ostali dijelovi liziranih stanica prošli kroz filter bez adsorpcije. Vežanje DNA bilo je reverzibilno i specifično za nukleinske kiseline. Naredna dva ispiranja DNA s puferima za ispiranje uklonila su proteine, a u posljednjem koraku se čista DNA eluirala u TRIS puferu (Slika 10.) te je čuvana na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 10. Shematski prikaz postupka izolacije DNA uporabom koloni sa silikatnom membranom

3.2.2. Određivanje gena *HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -11* i *-15*

U parovima majka/novorodjenče određeni su geni odnosno aleli *HPA-1a/b, -2a/b, -3a/b, -4a/b, -5a/b, -6a/b, -7 a/b, -8 a/b, -9 a/b, -11 a/b* i *-15 a/b* prema protokolu proizvođača testova ID HPA^{XT} (Grifols, Barcelona, Španjolska).

3.2.2.1. Umnažanje DNA metodom lančane reakcije polimerazom

Nakon izolacije, DNA se umnožila metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) koristeći oligonukleotidne probe i polimerazu DNA (HotStarTaq DNA Polimerase, Quiagen, Hilden, Njemačka).

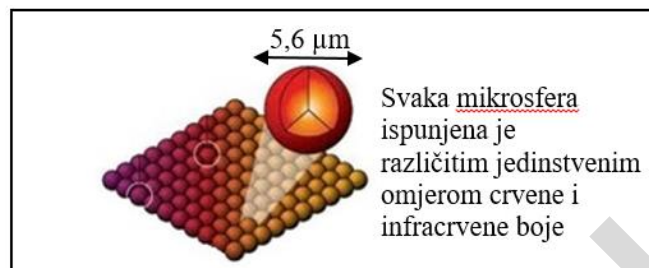
Ukupni volumen jedne reakcije PCR iznosio je 25 μ l (19,5 μ l ID HPA XT PC Master Mix, 0,5 μ l polimeraze HotStarTaq i 5 μ l uzorka DNA). Uvjeti reakcije PCR prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti umnažanja gena HPA prema protokolu proizvođača testova ID HPA^{XT}

Temperatura (°C)	Vrijeme inkubacije	Broj ciklusa
95	15 min	1
95	30 sek	40
60	30 sek	40
72	80 sek	40
72	7 min	1
4	∞	1

3.2.2.2. Hibridizacija umnoženih molekula DNA s oligonukleotidnim sondama specifičnim za alele HPA

Nakon denaturacije umnoženih molekula DNA na 95 °C slijedila je hibridizacija sa specifičnim oligonukleotidnim sondama označenima biotinom. Oligonukleotidne sonde bile su vezane na površinu polistirenskih mikrosfera (eng. *Multi-analyte profiling beads*, Xmap), dok su se u unutrašnjosti mikrosfera nalazile dvije fluorescentne boje – crveni i infracrveni fluorokromomi koji su se međusobno razlikovali po intenzitetu fluorescencije. Omjer navedenih boja bio je različit za svaku pojedinu mikrosferu (Slika 11.).



Slika 11. Shematski prikaz polistirenskih mikrosfera (eng. *Multi-Analyte Profiling Beads*, xMAP)

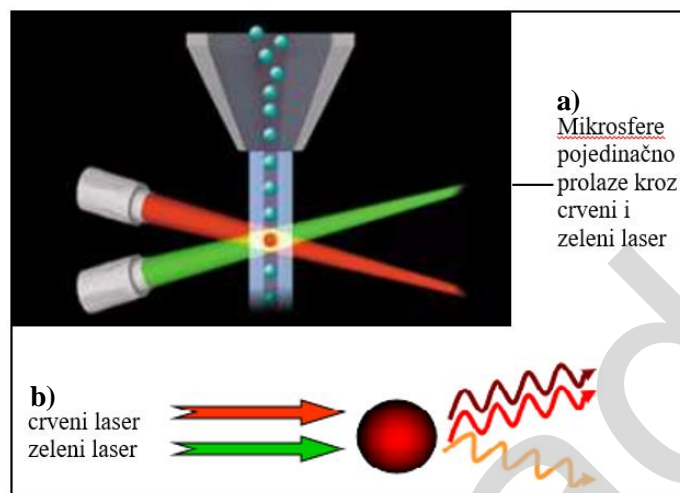
Ukupni volumen jedne hibridizacijske reakcije iznosio je 50 μl (4 μl produkta PCR-a i 46 μl otopine mikrosfera). Uvjeti hibridizacije prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti hibridizacije gena HPA prema protokolu proizvođača testova ID HPA^{XT}

Temperatura (°C)	Vrijeme inkubacije
95	2 min
52	30 min
52	∞

Odmah po završetku hibridizacije reakciji je dodano 80 μl pripremljene otopine fluorescentne boje za obilježavanje, odnosno 76 μl pufera za razrjeđivanje i 4 μl konjugata streptavidina i fikoeritrina (engl. *Streptavidin, Phycoerythrin Conjugate*, SA-PE) po uzorku. Streptavidin se vezao na biotinizirane dijelove DNA koji su nakon hibridizacije bili specifično vezani s oligonukleotidnim sondama na određenim mikrosferama.

Fluorescencija na uređaju Luminex očitana je s pomoću dva lasera te se temeljila na principima protočne citometrije. Crveni laser ekscitirao je mješavinu boja u mikrosferama, a zeleni laser ekscitirao je fluorofore (PE) vezane za površinu mikrosfera (Slika 12.).



Slika 12: a) Shematski prikaz očitavanja mikrosfera s pomoću dva lasera na uređaju Luminex
b) Shematski prikaz crvenog i zelenog lasera te emisije fluorescencije mikrosfera odnosno fluorofora na površini mikrosfera.

Rezultati su tumačeni s pomoću računalnog programa ID HPA XT (Grifols, Barcelona, Španjolska). Program je očitavao koje su se mikrosfere vezale na umnoženu DNA, odnosno određivao alel HPA.

3.2.3. Određivanje gena *HLA-DRB1/3/4/5*

U majki s dokazanom nepodudarnosti u antigenima HPA te u majki s dokazanim protutijelima anti-HPA, geni *HLA-DRB1/3/4/5* određivani su metodom PCR-SSO (*engl. Sequence Specific Oligos*) prema protokolu proizvođača testova LIFECODES® HLA-SSO Typing (Immucor, Stamford, SAD).

3.2.3.1. Umnažanje gena HLA metodom lančane reakcije polimerazom

Metoda PCR-SSO temeljila se na umnažanju egzona 2 za određivanje alela HLA razreda II. Preporučena koncentracija DNA za navedeni test bila je 50-100 ng/μl. Ukupni volumen jedne reakcije PCR iznosio je 20,2 μl (6 μl Lifecodes Master Mix, 9 μl Nuclease-free H₂O, 0,2 μl polimeraze Taq i 5 μl uzorka DNA), a uvjeti reakcije PCR prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Uvjeti umnažanja gena HLA metodom PCR-SSO

Temperatura (°C)	Vrijeme inkubacije	Broj ciklusa
95	3 min	1
95	15 sek	12
95	10 sek	28
72	2 min	1
4	∞	1

3.2.3.2. Hibridizacija umnoženih molekula DNA s oligonukleotidnim sondama sa sekvencama specifičnima za alele HLA

Nakon denaturacije umnoženih molekula DNA, nastali jednolančani produkti označeni biotinom bili su hibridizirani sa specifičnim oligonukleotidima sa sekvencama specifičnima za alele HLA. Oligonukleotidne sonde bile su vezane na površinu mikrosfera ispunjenih crvenim i infracrvenim fluorokromom te su se međusobno razlikovale po intenzitetu fluorescencije.

Ukupni volumen jedne hibridizacijske reakcije iznosio je 20 μ l (5 μ l produkta PCR-a i 15 μ l otopine mikrosfera), a sama hibridizacija trajala je 20 minuta (Tablica 5.).

Tablica 5. Uvjeti hibridizacije gena HLA metodom PCR-SSO

Temperatura (°C)	Vrijeme inkubacije
97	2 min
47	10 min
56	8 min
56	∞

Odmah po završetku, hibridizacijskoj je reakciji dodano 170 μ l pripremljene otopine fluorescentne boje za obilježavanje, odnosno 170 μ l pufera za razrjeđivanje i 0,85 μ l konjugata streptavidina i fikoeritrina (engl. *Streptavidin*, *Phycoerythrin Conjugate*, SA-PE) po uzorku. Streptavidin se vezao na biotinizirane dijelove DNA koji su nakon hibridizacije bili specifično vezani s probama na određenim mikrosferama.

Uređaj Luminex očitavao je fluorescenciju pomoću dva lasera, odnosno razlikovao kombinaciju proba s pozitivnim signalom na temelju njihove vezanosti s mikrosferama te

izračunavao relativnu količinu amplikona koji je hibridiziran sa svakom pojedinom mikrosferom. Testovi su izvođeni u pločicama s 96 bazenčića⁹¹.

Rezultati su očitani na fluoroanalizatoru Luminex 200 te tumačeni pomoću računalnog programa MATCH IT![®] DNA (Immucor, Stamford, SAD).

3.2.4. Pretraživanje protutijela anti-HPA u serumu majke

Serum majki ispitaio se na prisutnost protutijela anti-HPA-1, -2, -3, -4, -5, -GPIV te na protutijela anti-HLA razreda I metodom na mikrosferama prema uputi proizvođača testova LIFECODES Pak Lx Assay (Immucor, Waukesha, SAD)⁹².

Postupak se temeljio na inkubaciji seruma ispitanika s Pak Lx mikrosferama s crvenim i infracrvenim fluorokromom na koje su bili vezani specifični antigeni HPA. Ukoliko su u serumu bila prisutna protutijela, došlo bi do vezanja protutijela na mikrosferu koja je nosila specifični antigen HPA⁹³.

Nakon otapanja liofiliziranih mikrosfera u diluentu, u jažicu je dodano 40 µl mikrosfera i 10 µl seruma ispitanika te se uzorak inkubirao 60 min na sobnoj temperaturi u mraku, na vortex miješalici. Nakon inkubacije su se uzorci četiri puta ispirali s 250 µl pufera za pranje kako bi se uklonio višak nevezanih protutijela. Nakon ispiranja dodano je 50 µl razrijeđenog anti-humanog IgG protutijela koji je bio obilježen s fluorokromom fikoeritriinom (engl. *Phycoerythrin*, PE).

Nakon druge inkubacije pri istoj temperaturi, u mraku, u trajanju od 30 minuta, u uzorak je dodano 150 µl razrijeđenog pufera za pranje. Rezultati su odmah očitani na fluoroanalizatoru Luminex 200 (Immucor, Waukesha, SAD) i tumačeni pomoću računalnog programa LIFECODES MATCHIT (Immucor, Waukesha, SAD).

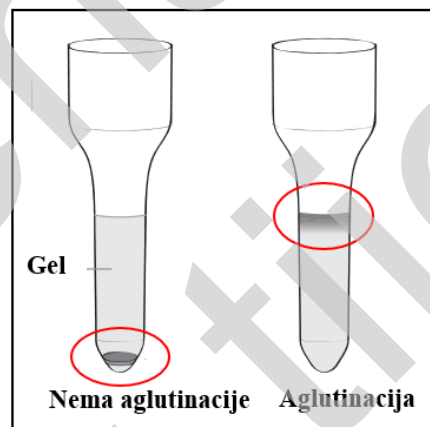
3.2.5. Određivanje antigena sustava ABO majke i novorođenčeta

Antigeni sustava ABO majke i novorođenčeta određeni su metodom u mikrokartici (Ortho Clinical Diagnostics, New Jersey, SAD). Za testiranje su korišteni uzorci pune krvi majke i uzorci krvi iz pupkovine uzeti u epruvete s EDTA.

Za određivanje krvne grupe ABO majke bilo je potrebno, uz određivanje antigena A i B na eritrocitima (hemotest), odrediti i protutijela anti-A i anti-B u plazmi ili serumu (eritrotest)⁹⁴. Eritrotest nije bio obavezan kod određivanja antigena sustava ABO novorođenčeta s obzirom na to da se protutijela anti-A i anti-B razvijaju tek nakon 4. mjeseca starosti⁹⁵.

Princip metode bila je aglutinacija eritrocita u mikrostupcu (Slika 13.). U određivanju antigena ABO na eritrocitima (hemotest) korišteni su mikrostupci s monoklonalnim protutijelima na antigene A i B u koje je dodano po 10 μ L 3-5 %-tne suspenzije eritrocita ispitanika⁹⁴. Monoklonalna protutijela vezala su se na prisutne antigene A i B na eritrocitima ispitanika te stvarala aglutinate. Aglutinati su uz centrifugiranje, ovisno o svojoj veličini, različito duboko putovali prema dnu mikrostupca, što je bilo vidljivo golim okom. Ukoliko na eritrocitima nisu bili prisutni antigeni, nije došlo do vezanja monoklonalnih protutijela na eritrocite ispitanika niti do stvaranja aglutinata, pa su se slobodni eritrociti spuštali i vidjeli na dnu mikrostupca.

U određivanju protutijela anti-A i anti-B u serumu ispitanika (eritrotest) korišteni su mikrostupci u koje je dodana 50 μ L 0,8 %-tne suspenzija test eritrocita A1 i B i 40 μ L plazme/seruma ispitanika. Ukoliko su u plazmi/serumu ispitanika bila prisutna protutijela anti-A i anti-B, ona su se vezala za antigene A i B na test eritrocitima te je došlo do aglutinacije u mikrostupcu. Ukoliko protutijela nisu bila prisutna, slobodni test eritrociti su pali na dno mikrostupca⁹⁴.



Slika 13. Shematski prikaz metode aglutinacije u mikrostupcu. Preuzeto i prilagođeno iz ⁹⁴.

3.3. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu koristio se statistički paket MedCalc® Statistical Software version 20.111 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija; <https://www.medcalc.org>; 2022) i SPSS Statistics 23 (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.), a dobiveni rezultati prikazani su tablično i grafički (histogrami).

Za testiranje Hardy-Weinberg ekvilibrija genotipskih frekvencija (χ^2 test $df=1$) koristio se Hardy-Weinberg equilibrium kalkulator (<https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/>). Analiza genotipova i haplotipska analiza (uz korekciju P vrijednosti Benjamini-Hochberg metodom) učinjene su online programom SNPstats i SHEsisPlus. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Hi-kvadrat testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Razina značajnosti postavljena je na $P=0,05$.

4. REZULTATI

U populacijskom dijelu istraživanja o raznovrsnosti gena HPA, nepodudarnosti u antigenima HPA i ABO te o učestalosti fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA sudjelovalo je 270 parova majka/novorodenče, dok su 22 para majka/novorodenče bila uključena u dio istraživanja o učestalosti protutijela anti-HPA i anti-HLA u majki čija su djeca imala FNAIT.

4.1. Učestalost alela, genotipova i fenotipova HPA u skupini nesrodnih ispitanica

Od ukupno 270 ispitanica, 32 su bile isključene iz prikaza učestalosti alela i genotipova HPA s obzirom na to da u navedenih ispitanica niti jedan od roditelja nije bio podrijetlom iz Hrvatske.

4.1.1. Učestalost alela i genotipova HPA u skupini nesrodnih ispitanica

U skupini nesrodnih ispitanica (N=238) ispitivana je učestalost alela *HPA-1a/b*, *-2a/b*, *-3a/b*, *-4a/b*, *-5a/b*, *-6a/b*, *-7a/b*, *-8a/b*, *-9a/b*, *-11a/b* i *-15a/b* (Tablica 6.).

Tablica 6. Učestalosti alela i genotipova HPA u skupini ispitanica (N=238)

Geni HPA	Aleli / genotipovi	n (%)	HWE	Geni HPA	Aleli / genotipovi	n (%)	HWE
HPA-1	<i>a</i>	389 (81,7)	0,13	HPA-7	<i>a</i>	475 (99,8)	> 0,99
	<i>b</i>	87 (18,3)			<i>b</i>	1 (0,2)	
	<i>aa</i>	155 (65,1)			<i>aa</i>	237 (99,8)	
	<i>ab</i>	79 (33,2)			<i>ab</i>	1 (0,2)	
	<i>bb</i>	4 (1,7)			<i>bb</i>	0 (0,0)	
HPA-2	<i>a</i>	424 (89,1)	0,33	HPA-8	<i>a</i>	475 (99,8)	> 0,99
	<i>b</i>	52 (10,9)			<i>b</i>	1 (0,2)	
	<i>aa</i>	187 (78,6)			<i>aa</i>	237 (99,8)	
	<i>ab</i>	50 (21,0)			<i>ab</i>	1 (0,2)	
	<i>bb</i>	1 (0,4)			<i>bb</i>	0 (0,0)	
HPA-3	<i>a</i>	273 (57,4)	0,19	HPA-9	<i>a</i>	473 (99,4)	> 0,99
	<i>b</i>	203 (42,6)			<i>b</i>	3 (0,6)	
	<i>aa</i>	73 (30,7)			<i>aa</i>	235 (98,7)	
	<i>ab</i>	127 (53,4)			<i>ab</i>	3 (1,3)	
	<i>bb</i>	38 (15,9)			<i>bb</i>	0 (0,0)	
HPA-4	<i>a</i>	476 (100)	/	HPA-11	<i>a</i>	475 (99,8)	> 0,99
	<i>b</i>	0 (0,0)			<i>b</i>	1 (0,2)	
	<i>aa</i>	238 (100)			<i>aa</i>	237 (99,6)	
	<i>ab</i>	0 (0,0)			<i>ab</i>	1 (0,2)	
	<i>bb</i>	0 (0,0)			<i>bb</i>	0 (0,0)	
HPA-5	<i>a</i>	410 (86,1)	0,01	HPA-15	<i>a</i>	243 (51,1)	0,03
	<i>b</i>	66 (13,9)			<i>b</i>	233 (48,9)	
	<i>aa</i>	172 (72,3)			<i>aa</i>	53 (22,3)	
	<i>ab</i>	66 (27,7)			<i>ab</i>	137 (57,5)	
	<i>bb</i>	0 (0,0)			<i>bb</i>	48 (20,2)	
HPA-6	<i>a</i>	476 (100)	/				
	<i>b</i>	0 (0,0)					
	<i>aa</i>	238 (100)					
	<i>ab</i>	0 (0,0)					
	<i>bb</i>	0 (0,0)					

Kratice: n – broj uočenih alela/genotipova HPA, % – učestalost alela/genotipova HPA,

HWE – Hardy-Weinberg ekvilibrium, / – vrijednost za navedene genotipske frekvencije nije računata

Podjednaka raspodjela alela *a* i *b* dokazana je za gene *HPA-3* i *-15*. Učestalost alela *a* > 80 % uočena je za gene *HPA-1*, *-2* i *-5*, a učestalost > 90 % za gene *HPA-4*, *-6*, *-7*, *-8*, *-9* i *-11*. Među svim ispitivanim genima HPA alel *a* bio je učestaliji od alela *b*. U istraživanju niti jednom nije uočen alel *HPA-4b*, *-6b* niti *-11b*; aleli *HPA-7b* i *-8b* uočeni su jednom (0,2 %), a aleli *HPA-9b* tri puta (0,6 %).

Raspodjela genotipova za gene HPA ne pokazuje značajno odstupanje Hardy-Weinberg ekvilibriuma (eng. *Hardy-Weinberg Equilibrium*, HWE), izuzev odstupanja za gene *HPA-5* i *-15* (Tablica 6.).

Uz izuzetak homozigota *HPA-3aa* (30,7 %) i *-15aa* (22,3 %), učestalosti homozigota *HPA-1aa*, *-2aa*, *-4aa*, *-5aa*, *-6aa*, *-7aa*, *-8aa*, *-9aa* i *-11aa* bile su veće od učestalosti heterozigota *ab* i homozigota *bb*.

4.1.2. Učestalost fenotipova HPA u skupini nesrodnih ispitanica

Ispitivan je fenotip HPA koji obuhvaća 22 alela HPA: *HPA-1a/b*, *-2a/b*, *-3a/b*, *-4a/b*, *-5a/b*, *-6a/b*, *-7a/b*, *-8a/b*, *-9a/b*, *-11a/b* i *-15a/b*. U skupini nesrodnih ispitanica uočeno je ukupno 66 različitih fenotipova HPA. U Tablici 7. prikazani su fenotipovi HPA s učestalošću > 1 %.

Tablica 7. Prikaz fenotipova HPA s učestalošću > 1 % u skupini ispitanica (N=238)

Fenotipovi	n (%)
<i>HPA-1aa2aa3ab4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15ab</i>	26 (10,9)
<i>HPA-1aa2aa3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15ab</i>	16 (6,7)
<i>HPA-1aa2aa3bb4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15ab</i>	14 (5,9)
<i>HPA-1ab2aa3ab4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15ab</i>	14 (5,9)
<i>HPA-1aa2aa3ab4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15bb</i>	13 (5,5)
<i>HPA-1aa2aa3ab4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15aa</i>	11 (4,6)
<i>HPA-1aa2ab3ab4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15ab</i>	9 (3,8)
<i>HPA-1aa2aa3aa4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15ab</i>	8 (3,4)
<i>HPA-1aa2aa3ab4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15ab</i>	7 (2,9)
<i>HPA-1ab2aa3ab4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15ab</i>	7 (2,9)
<i>HPA-1aa2aa3ab4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15bb</i>	6 (2,5)
<i>HPA-1ab2aa3bb4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15ab</i>	6 (2,5)
<i>HPA-1aa2aa3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15aa</i>	5 (2,1)
<i>HPA-1ab2aa3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15aa</i>	5 (2,1)
<i>HPA-1ab2ab3ab4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15ab</i>	5 (2,1)
<i>HPA-1aa2aa3ab4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15aa</i>	4 (1,7)
<i>HPA-1ab2aa3ab4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15aa</i>	4 (1,7)
<i>HPA-1ab2aa3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15ab</i>	4 (1,7)
<i>HPA-1ab2aa3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15bb</i>	4 (1,7)
<i>HPA-1aa2aa3aa4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15aa</i>	3 (1,3)
<i>HPA-1ab2aa3aa4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15ab</i>	3 (1,3)
<i>HPA-1aa2ab3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15aa</i>	3 (1,3)
<i>HPA-1aa2ab3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15ab</i>	3 (1,3)
<i>HPA-1aa2ab3ab4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15aa</i>	3 (1,3)

Kratice: n – broj uočenih fenotipova HPA, % učestalost fenotipova HPA

Ukupno su uočena 24 (36,4 %) fenotipa HPA s učestalošću > 1 %. Pet najučestalijih fenotipova (> 5,0 %) uočeno je kod 83 (34,9 %) ispitanice. Preostalih 19 fenotipova HPA uočeno je kod 100 (42,0 %) ispitanica.

Četrdeset dva (23,1 %) fenotipa HPA s učestalošću ≤ 1 % prikazani su u Tablici 8. Trinaest fenotipova HPA uočeno je u dvije ispitanice, a 29 fenotipova HPA uočeno je u jedne ispitanice.

Tablica 8. Prikaz fenotipova HPA u ispitanica s učestalošću $\leq 1\%$ (N=238)

Fenotipovi	n (%)
HPA-1aa2aa3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15bb	2 (0,8)
HPA-1ab2ab3aa4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15ab	2 (0,8)
HPA-1ab2ab3ab4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15aa	2 (0,8)
HPA-1aa2aa3bb4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15ab	2 (0,8)
HPA-1aa2aa3bb4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15bb	2 (0,8)
HPA-1aa2aa3bb4aa5ab6aa7aa8aa9ab11aa15bb	2 (0,8)
HPA-1aa2ab3ab4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15ab	2 (0,8)
HPA-1ab2aa3ab4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15bb	2 (0,8)
HPA-1ab2ab3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15aa	2 (0,8)
HPA-1aa2ab3aa4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15aa	2 (0,8)
HPA-1ab2aa3ab4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15bb	2 (0,8)
HPA-1ab2aa3bb4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15aa	2 (0,8)
HPA-1bb2aa3ab4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15ab	2 (0,8)
HPA-1aa2aa3aa4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15bb	1 (0,4)
HPA-1aa2aa3ab4aa5ab6aa7ab8aa9aa11aa15ab	1 (0,4)
HPA-1aa2aa3bb4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15aa	1 (0,4)
HPA-1aa2aa3bb4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15aa	1 (0,4)
HPA-1aa2aa3ab4aa5aa6aa7aa8aa9ab11aa15bb	1 (0,4)
HPA-1aa2ab3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15bb	1 (0,4)
HPA-1aa2ab3ab4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15bb	1 (0,4)
HPA-1aa2ab3ab4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15aa	1 (0,4)
HPA-1aa2ab3bb4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15aa	1 (0,4)
HPA-1aa2ab3bb4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15ab	1 (0,4)
HPA-1aa2ab3bb4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15bb	1 (0,4)
HPA-1aa2ab3bb4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15ab	1 (0,4)
HPA-1ab2aa3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11ab15bb	1 (0,4)
HPA-1ab2aa3aa4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15bb	1 (0,4)
HPA-1ab2aa3aa4aa5ab6aa7aa8ab9aa11aa15ab	1 (0,4)
HPA-1ab2aa3bb4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15bb	1 (0,4)
HPA-1ab2ab3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15ab	1 (0,4)
HPA-1ab2ab3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15bb	1 (0,4)
HPA-1ab2ab3ab4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15bb	1 (0,4)
HPA-1ab2ab3ab4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15ab	1 (0,4)
HPA-1ab2ab3ab4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15bb	1 (0,4)
HPA-1ab2ab3bb4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15aa	1 (0,4)
HPA-1ab2ab3bb4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15bb	1 (0,4)
HPA-1ab2ab3bb4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15bb	1 (0,4)
HPA-1ab2ab3bb4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15bb	1 (0,4)
HPA-1ab2bb3aa4aa5ab6aa7aa8aa9aa11aa15bb	1 (0,4)
HPA-1bb2aa3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15ab	1 (0,4)
HPA-1bb2aa3aa4aa5aa6aa7aa8aa9aa11aa15bb	1 (0,4)

Kratice: n – broj uočenih fenotipova HPA, % – učestalost fenotipova HPA

4.2. Učestalost alela i genotipova HPA u skupini novorođenčadi

U skupini novorođenčadi (N=238) također je analizirana učestalost alela i genotipova HPA, a dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 9.

Tablica 9. Učestalosti alela i genotipova HPA u skupini novorođenčadi (N=238)

Geni HPA	Aleli/genotipovi	n (%)	HWE	Geni HPA	Aleli/genotipovi	n (%)	HWE
HPA-1	<i>a</i>	372 (78,2)	0,71	HPA-7	<i>a</i>	476 (100)	/
	<i>b</i>	104 (21,8)			<i>b</i>	0 (0,0)	
	<i>aa</i>	144 (60,5)			<i>aa</i>	238 (100)	
	<i>ab</i>	84 (35,3)			<i>ab</i>	0 (0,0)	
	<i>bb</i>	10 (4,2)			<i>bb</i>	0 (0,0)	
HPA-2	<i>a</i>	424 (89,1)	> 0,99	HPA-8	<i>a</i>	474 (99,6)	> 0,99
	<i>b</i>	52 (10,9)			<i>b</i>	2 (0,4)	
	<i>aa</i>	188 (79,0)			<i>aa</i>	236 (99,2)	
	<i>ab</i>	48 (20,2)			<i>ab</i>	2 (0,8)	
	<i>bb</i>	2 (0,8)			<i>bb</i>	0 (0,0)	
HPA-3	<i>a</i>	282 (59,2)	0,23	HPA-9	<i>a</i>	475 (99,8)	> 0,99
	<i>b</i>	194 (40,8)			<i>b</i>	1 (0,2)	
	<i>aa</i>	88 (37,0)			<i>aa</i>	237 (99,6)	
	<i>ab</i>	106 (44,5)			<i>ab</i>	1 (0,4)	
	<i>bb</i>	44 (18,5)			<i>bb</i>	0 (0,0)	
HPA-4	<i>a</i>	475 (99,8)	> 0,99	HPA-11	<i>a</i>	475 (99,8)	> 0,99
	<i>b</i>	1 (0,2)			<i>b</i>	1 (0,2)	
	<i>aa</i>	237 (99,6)			<i>aa</i>	237 (99,6)	
	<i>ab</i>	1 (0,4)			<i>ab</i>	1 (0,4)	
	<i>bb</i>	0 (0,0)			<i>bb</i>	0 (0,0)	
HPA-5	<i>a</i>	401 (84,2)	0,47	HPA-15	<i>a</i>	247 (51,9)	0,90
	<i>b</i>	75 (15,8)			<i>b</i>	229 (48,1)	
	<i>aa</i>	167 (70,2)			<i>aa</i>	61 (26,5)	
	<i>ab</i>	67 (28,2)			<i>ab</i>	121 (50,8)	
	<i>bb</i>	4 (1,7)			<i>bb</i>	54 (22,7)	
HPA-6	<i>a</i>	476 (100)	/				
	<i>b</i>	0 (0,0)					
	<i>aa</i>	238 (100)					
	<i>ab</i>	0 (0,0)					
	<i>bb</i>	0 (0,0)					

Kratice: n – broj uočenih alela/genotipova HPA, % – učestalost alela/genotipova HPA,

HWE – Hardy-Weinberg ekvilibrium, / – vrijednost za navedene genotipske frekvencije nije računata

Raspodjela genotipova za gene HPA ne pokazuje značajno odstupanje HWE za niti jedan od ispitivanih gena HPA.

U usporedbi raspodjele alela i genotipova HPA između skupine ispitanica i njihove novorođenčadi nije uočena statistički značajna razlika.

4.3. Analiza nepodudarnosti u antigenima HPA u skupini parova majka/novorodenče

Usporedba alela *HPA-1a/b*, *-2a/b*, *-3a/b*, *-4a/b*, *-5a/b*, *-6a/b*, *-7a/b*, *-8a/b*, *-9a/b*, *-11a/b* i *-15a/b* za svaki pojedini par majka/novorodenče pokazala je da je 156 (57,8 %) parova bilo nepodudarno u antigenima HPA.

4.3.1. Nepodudarnosti u antigenima HPA u parovima majka/novorodenče

Kod 156 HPA nepodudarnih parova majka/novorodenče uočeno je 38 različitih kombinacija nepodudarnosti u antigenima HPA. U Tablici 10. prikazano je 18 (47,4 %) nepodudarnosti u antigenima HPA s učestalošću > 1 %.

Tablica 10. Nepodudarnosti antigena HPA u parovima majka/novorođenče s učestalošću > 1 % (N=156)

Nepodudarnosti u antigenima HPA		n (%)
1	HPA-1b	23 (14,7)
2	HPA-2b	10 (6,4)
3	HPA-3a	15 (9,6)
4	HPA-3b	15 (9,6)
5	HPA-5b	15 (9,6)
6	HPA-15a	20 (12,8)
7	HPA-15b	9 (5,8)
8	HPA-1b + HPA-2b	3 (1,9)
9	HPA-1b + HPA-3a	2 (1,3)
10	HPA-1b + HPA-5b	4 (2,6)
11	HPA-1b + HPA-15b	3 (1,9)
12	HPA-2b + HPA-3b	2 (1,3)
13	HPA-2b + HPA-15a	3 (1,9)
14	HPA-3a + HPA-15a	2 (1,3)
15	HPA-3a + HPA-15b	2 (1,3)
16	HPA-3b + HPA-15b	4 (2,6)
17	HPA-5b + HPA-15a	2 (1,3)
18	HPA-1b + HPA-5b + HPA-15b	2 (1,3)

Kratice: n – broj pojedinih nepodudarnosti u antigenima HPA u parovima majka/novorođenče,
% – učestalost navedenih nepodudarnosti

Sedam najučestalijih nepodudarnosti u antigenima HPA (> 5,0 %) uočeno je u 107 (68,6 %) ispitanica. Preostalih 11 nepodudarnosti (< 5 %) uočeno je u 49 (31,4 %) ispitanica.

Dvadeset (52,6 %) nepodudarnosti u parovima majka/novorođenče uočeno je samo jednom (0,6 %) (Tablica 11.).

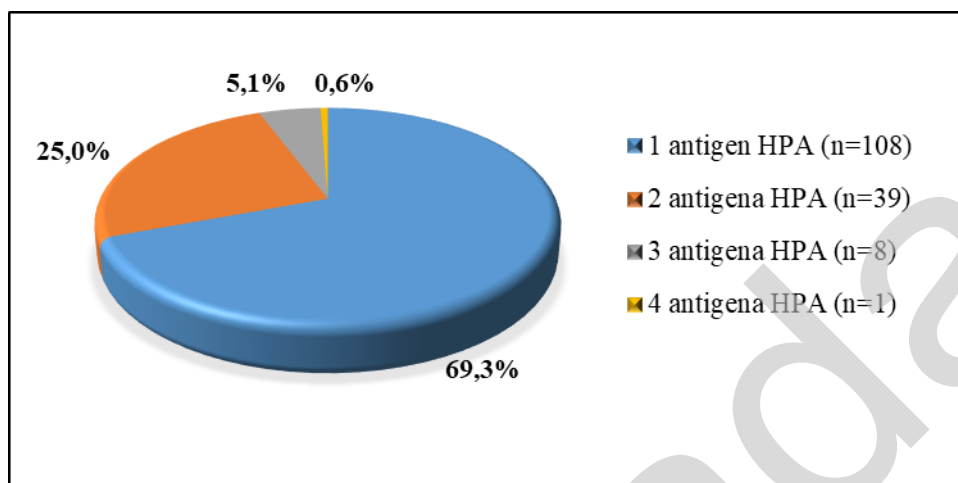
Tablica 11. Nepodudarnosti antigena HPA koje su uočene samo u jednog para majka/novorodjenče (N=156)

Nepodudarnosti u antigenima HPA	
1	HPA-1a
2	HPA-1a + HPA-2b
3	HPA-1a + HPA-3a
4	HPA-1b + HPA-2b + HPA-5b
5	HPA-1b + HPA-3a + HPA-5b
6	HPA-1b + HPA-4b + HPA-5b + HPA-15a
7	HPA-2a + HPA-15a
8	HPA-2a + HPA-15b
9	HPA-2b + HPA-15b
10	HPA-2b + HPA-3a
11	HPA-2b + HPA-3a + HPA-5b
12	HPA-2b + HPA-3b + HPA-15b
13	HPA-2b + HPA-5b
14	HPA-2b + HPA-5b + HPA-15b
15	HPA-2b + HPA-8b
16	HPA-3a + HPA-5b
17	HPA-3b + HPA-15a
18	HPA-3b + HPA-5b + HPA-15b
19	HPA-5b + HPA-15b
20	HPA-8b + HPA-5b

Kratice: n – broj pojedinih nepodudarnosti u antigenima HPA u parovima majka/novorodjenče, % – učestalost navedenih nepodudarnosti

Od 156 ispitivanih nepodudarnih parova majka/novorodjenče, njih 108 (69,2 %) bilo je nepodudarno samo u jednom antigenu HPA, dok je 48 (30,8 %) parova majka/novorodjenče imalo nepodudarnost u više od jednog antigena HPA.

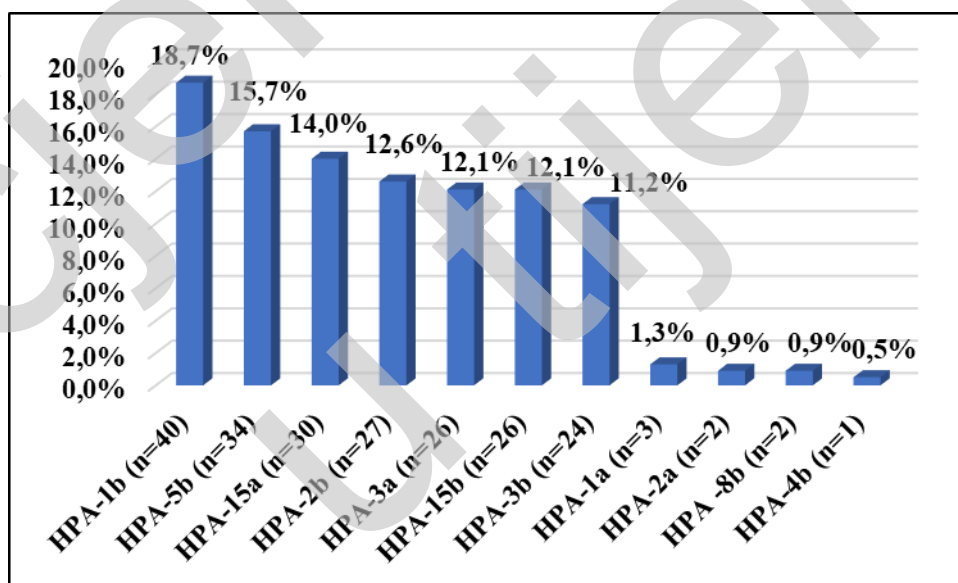
Od nepodudarnosti koje su obuhvaćale više antigena HPA, najučestalije su bile nepodudarnosti u dva antigena HPA, uočene u 39 (25,0 %) parova majka/novorodjenče (Slika 14).



Slika 14. Učestalost nepodudarnosti prema broju antigena HPA u parovima majka/novorodjenče (N=156)

4.3.2. Analiza ukupnog broja nepodudarnih antigena HPA u parovima majka/novorodjenče

U 156 parova majka/novorodjenče uočeno je ukupno 213 nepodudarnih antigena HPA (Slika 15.).



Slika 15. Učestalost pojedinih nepodudarnih antigena HPA u parovima majka/novorodjenče (N=156)

Najučestalija nepodudarnost zabilježena je u antigenima HPA-1b (18,7 %). Iza navedene nepodudarnosti u antigenima HPA-1b, po učestalosti slijede: HPA-5b > 15 %; HPA-2b, -3a/b

i -15a/b > 10 % te HPA-1a 1,3 %. Najmanje učestale nepodudarnosti (< 1 %) zabilježene su u antigenima HPA-2a, -4b i -8b.

4.4. Geni *HLA-DRB1/3/4/5* i genotipovi *HLA-DRB1/DRB1*, *HLA-DRB3/DRB3*, *HLA-DRB4/DRB4* te *HLA-DRB5/DRB5* ispitanica s dokazanom nepodudarnošću u samo jednom antigenu HPA s novorođenčtom

Geni *HLA-DRB1/3/4/5* analizirani su u skupini ispitanica s potvrđenom nepodudarnosti s novorođenčtom u samo jednom antigenu HPA (N=108). Ispitivanje gena HLA obuhvaćalo je sve dokazane nepodudarnosti u parovima majka/novorođenče, odnosno nepodudarnosti u antigenima HPA-1a/b, -2a/b, -3a/b, -4b, -5b, -8b i -15a/b.

4.4.1. Geni *HLA-DRB1* i genotipovi *HLA-DRB1/DRB1* ispitanica s dokazanom nepodudarnošću u samo jednom antigenu HPA s novorođenčtom

U Tablicama 12.-14. prikazani su uočeni geni *HLA-DRB1* i pripadajući genotipovi u skupini od 108 ispitanica.

U navedenih ispitanica ukupno je uočeno 13 različitih gena *HLA-DRB1* (Tablica 12.). Najučestaliji gen bio je *HLA-DRB1*11* (22,2 %). Iza navedenog gena slijede geni s učestalošću > 10 % : *HLA-DRB1*01* i *HLA-DRB1*04*, potom geni s učestalošću > 5 %: *HLA-DRB1*03*, *HLA-DRB1*07*, *HLA-DRB1*15* i *HLA-DRB1*16*, te geni s učestalošću < 5 %: *HLA-DRB1*08*, *HLA-DRB1*09*, *HLA-DRB1*10*, *HLA-DRB1*12* i *HLA-DRB1*14*.

Tablica 12. Raspodjela gena *HLA-DRB1* ispitanica prema nepodudarnostima u jednom antigenu HPA (N=108)

Geni <i>HLA-DRB1</i> * (n; %)	Nepodudarnosti u antigenima HPA							
	HPA-1a N=1 n (%)	HPA-1b N=23 n (%)	HPA-2b N=10 n (%)	HPA-3a N=15 n (%)	HPA-3b N=15 n (%)	HPA-5b N=15 n (%)	HPA-15a N=20 n (%)	HPA-15b N=9 n (%)
01 (n=23; 10,7)	1 (4,3)	5 (21,7)	4 (17,4)	5 (21,7)	3 (13,9)	1 (4,3)	2 (8,7)	2 (8,7)
03 (n=17; 7,9)	/	4 (23,5)	2 (11,8)	/	1 (5,9)	3 (17,6)	4 (23,5)	3 (17,6)
04 (n=27; 12,5)	/	4 (14,8)	4 (14,8)	4 (14,8)	4 (14,8)	4 (14,8)	2 (7,4)	5 (18,5)
07 (n=15; 6,9)	/	5 (33,3)	2 (13,3)	2 (13,3)	2 (13,3)	2 (13,3)	1 (6,7)	1 (6,7)
08 (n=8; 3,7)	/	2 (25,0)	/	1 (12,5)	3 (37,5)	/	2 (25,0)	/
09 (n=1; 0,5)	/	/	/	/	/	/	1 (100,0)	/
10 (n=4; 1,9)	1 (25,0)	/	1 (25,0)	/	/	1 (25,0)	1 (25,0)	/
11 (n=48; 22,2)	/	9 (18,8)	2 (4,2)	7 (14,6)	5 (10,4)	9 (18,8)	12 (25,0)	4 (8,3)
12 (n=6; 2,8)	/	1 (16,7)	/	1 (16,7)	2 (33,3)	1 (16,7)	1 (16,7)	/
13 (n=24; 11,1)	/	5 (20,8)	3 (12,5)	3 (12,5)	5 (20,8)	3 (12,5)	4 (16,7)	1 (4,2)
14 (n=4; 1,9)	/	2 (50,0)	/	1 (25,0)	/	1 (25,0)	/	/
15 (n=19; 8,8)	/	5 (26,3)	1 (5,3)	3 (15,8)	1 (5,3)	4 (21,1)	5 (26,3)	2 (10,5)
16 (n=20; 9,3)	/	4 (20,0)	1 (5,0)	3 (15,0)	4 (20,0)	2 (10,0)	6 (30,0)	/

Kratice: N – broj ispitanica, n – broj uočenih gena *HLA-DRB1*, % – učestalost navedenih gena

Nije zamijećena statistički značajna razlika u učestalosti gena *HLA-DRB1* u ispitanica prema pojedinim nepodudarnostima u antigenima HPA.

U 108 ispitanica ukupno je uočeno 49 različitih genotipova *HLA-DRB1/DRB1* (Tablica 13). Učestalost > 1 % uočena je za 21 (42,9 %) genotip *HLA-DRB1/DRB1*. Najučestaliji genotip bio je *HLA-DRB1*11/DRB1*11*.

Tablica 13. Genotipovi *HLA-DRB1/DRB1* ispitanica prema nepodudarnostima u jednom antigenu HPA s učestalošću > 1 % (N=108)

Genotipovi <i>HLA-DRB1*/DRB1*</i> (n; %)	Nepodudarnosti u antigenima HPA						
	HPA-1b N=23, n (%)	HPA-2b N=10, n (%)	HPA-3a N=1, n (%)	HPA-3b N=15, n (%)	HPA-5b N=15, n (%)	HPA-15a N=20, n (%)	HPA-15b N=9, n (%)
01/11 (n=7; 6,5)	2 (28,6)	1 (14,3)	1 (14,3)	1 (14,3)	1 (14,3)	/	1 (14,3)
01/13 (n=2; 1,9)	/	1 (50,0)	/	1 (50,0)	/	/	/
01/15 (n=5; 4,6)	1 (20,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	/	/	1 (20,0)	1 (20,0)
01/16 (n=4; 3,7)	/	/	2 (50,0)	1 (25,0)	/	1 (25,0)	/
03/04 (n=6; 5,6)	1 (16,7)	/	/	/	1 (16,7)	1 (16,7)	3 (50,0)
03/07 (n=2; 1,9)	1 (50,0)	1 (50,0)	/	/	/	/	/
03/11 (n=2; 1,9)	/	/	/	/	/	2 (100,0)	/
03/13 (n=2; 1,9)	/	/	/	/	1 (50,0)	1 (50,0)	/
04/04 (n=2; 1,9)	/	1 (50,0)	/	1 (50,0)	/	/	/
04/11 (n=6; 5,6)	/	1 (16,7)	/	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (33,3)
04/13 (n=4; 3,7)	/	/	2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	/	/
04/16 (n=3; 2,8)	2 (66,7)	1 (33,3)	/	/	/	/	/
07/11 (n=2; 1,9)	/	/	1 (50,0)	/	/	1 (50,0)	/
07/15 (n=4; 3,7)	1 (25,0)	/	1 (25,0)	/	1 (25,0)	/	1 (25,0)
08/13 (n=4; 3,7)	/	/	/	2 (50,0)	/	2 (50,0)	/
11/11 (n=8; 7,4)	1 (12,5)	/	1 (12,5)	1 (12,5)	3 (37,5)	2 (25,0)	/
11/13 (n=4; 3,7)	2 (50,0)	/	1 (25,0)	/	/	/	1 (25,0)
11/15 (n=6; 5,6)	2 (33,3)	/	1 (16,7)	/	1 (16,7)	2 (33,3)	/
11/16 (n=3; 2,8)	/	/	/	1 (33,3)	/	2 (66,7)	/
13/13 (n=2; 1,9)	1 (50,0)	1 (50,0)	/	/	/	/	/
13/16 (n=2; 1,9)	/	/	/	1 (50,0)	/	1 (50,0)	/

Kratice: N – broj ispitanica, n – broj uočenih genotipova *HLA-DRB1/DRB1*, % – učestalost navedenih genotipova

U ispitanica s nepodudarnosti u jednom antigenu HPA, 28 (57,1 %) genotipova *HLA-DRB1/DRB1* uočeno je samo jednom (0,9 %) (Tablica 14.).

Tablica 14. Genotipovi *HLA-DRB1/DRB1* ispitanica prema nepodudarnostima u jednom antigenu HPA koji su uočeni samo jednom (N=108)

Genotipovi <i>HLA-DRB1*/DRB1*</i>	Nepodudarnosti u antigenima HPA						
	HPA-1a N=1, n (%)	HPA-1b N=23, n (%)	HPA-2b N=10, n (%)	HPA-3a N=15, n (%)	HPA-3b N=15, n (%)	HPA-5b N=15, n (%)	HPA-15a N=20, n (%)
01/01	/	1 (100,0)	/	/	/	/	/
01/04	/	/	/	1 (100,0)	/	/	/
01/07	/	/	1 (100,0)	/	/	/	/
01/10	1 (100,0)	/	/	/	/	/	/
03/03	/	1 (100,0)	/	/	/	/	/
03/10	/	/	1 (100,0)	/	/	/	/
03/14	/	/	/	/	/	1 (100,0)	/
03/15	/	/	/	/	1(100,0)	/	/
04/10	/	/	/	/	/	1 (100,0)	/
04/12	/	/	/	1 (100,0)	/	/	/
04/14	/	1 (100,0)	/	/	/	/	/
07/07	/	1 (100,0)	/	/	/	/	/
07/08	/	/	/	/	1 (100,0)	/	/
07/12	/	/	/	/	1 (100,0)	/	/
07/13	/	1 (100,0)	/	/	/	/	/
08/11	/	1 (100,0)	/	/	/	/	/
08/12	/	1 (100,0)	/	/	/	/	/
08/16	/	/	/	1 (100,0)	/	/	/
09/16	/	/	/	/	/	/	1 (100,0)
10/16	/	/	/	/	/	/	1 (100,0)
11/14	/	/	/	1 (100,0)	/	/	/
12/13	/	/	/	/	/	1 (100,0)	/
12/15	/	/	/	/	/	/	1 (100,0)
12/16	/	/	/	/	1 (100,0)	/	/
13/15	/	/	/	/	1 (100,0)	/	/
14/16	/	1 (100,0)	/	/	/	/	/
15/16	/	1 (100,0)	/	/	/	/	/
16/16	/	/	/	/	/	1 (100,0)	/

Kratice: N – broj ispitanica, n – broj uočenih gena *HLA-DRB1*, % – učestalost navedenih gena

4.4.2. Geni *HLA-DRB3* i genotipovi *HLA-DRB3/DRB3* ispitanica s dokazanom nepodudarnošću u samo jednom antigenu HPA s novorođenčeta

U 77 od 108 (71,3 %) ispitanica uočena su 3 različita gena *HLA-DRB3*, odnosno 8 različitih genotipova *HLA-DRB3/DRB3* (Tablica 15.). U 55 (50,9 %) ispitanica uočen je samo jedan gen *HLA-DRB3*, dok su dva gena *HLA-DRB3* uočena u 22 (20,4 %) ispitanice.

U 31 (28,7 %) ispitanice gen *HLA-DRB3* nije bio prisutan. Nadalje, u ispitanice s nepodudarnošću u antigenu HPA-1a (nije prikazana u tablici) geni *HLA-DRB3* nisu bili prisutni.

Tablica 15. Geni *HLA-DRB3* i genotipovi *HLA-DRB3/DRB3* ispitanica prema nepodudarnostima u jednom antigenu HPA (N=108)

Geni <i>HLA-DRB3</i> * (n; %)	Nepodudarnosti u antigenima HPA						
	HPA-1b N=23, n (%)	HPA-2b N=10, n (%)	HPA-3a N=15, n (%)	HPA-3b N=15, n (%)	HPA-5b N=15, n (%)	HPA-15a N=20, n (%)	HPA-15b N=9, n (%)
01 (n=23; 23,2)	6 (26,1)	3 (13,0)	2 (8,7)	2 (8,7)	3 (13,0)	5 (21,7)	2 (8,7)
02 (n=68; 68,7)	12 (17,6)	2 (2,9)	9 (13,2)	10 (14,7)	14 (20,6)	16 (23,5)	5 (7,4)
03 (n=8, 8,1)	3 (37,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	/	1 (12,5)
Genotipovi <i>HLA-DRB3*/DRB3*</i> (n; %)	HPA-1b N=23, n (%)	HPA-2b N=10, n (%)	HPA-3a N=15, n (%)	HPA-3b N=15, n (%)	HPA-5b N=15, n (%)	HPA-15a N=20, n (%)	HPA-15b N=9, n (%)
01/- (n=13; 16,9)	2 (15,4)	2 (15,4)	2 (15,4)	2 (15,4)	1 (7,7)	2 (15,4)	2 (15,4)
01/01 (n=2; 2,6)	1 (50,0)	/	/	/	/	1 (50,0)	/
01/02 (n=4; 5,2)	1 (25,0)	/	/	/	2 (50,0)	1 (25,0)	/
01/03 (n=2, 2,6)	1 (50,0)	1 (50,0)	/	/	/	/	/
02/- (n=39; 50,6)	8 (20,5)	2 (5,1)	4 (10,3)	8 (20,5)	4 (10,3)	9 (23,1)	4 (10,3)
02/02 (n=11; 14,3)	1 (9,1)	/	2 (18,2)	1 (9,1)	4 (36,4)	3 (27,3)	/
02/03 (n=3, 3,9)	1 (33,3)	/	1 (33,3)	/	/	/	1 (33,3)
03/- (n=3, 3,9)	1 (33,3)	/	/	1 (33,3)	1 (33,3)	/	/

Kratice: N – broj ispitanica, n – broj uočenih gena *HLA-DRB3* / genotipova *HLA-DRB3/DRB3*, % – učestalost navedenih gena/genotipova, - – haplotip *HLA-DRB3* koji nije pozitivan za gen *HLA-DRB3*

Od svih uočenih gena *HLA-DRB3*, najučestaliji je bio *HLA-DRB3*02*. Iza navedenog gena prema učestalosti slijedio je gen *HLA-DRB3*01* te potom gen *HLA-DRB3*03*.

Nije zamijećena statistički značajna razlika učestalosti gena *HLA-DRB3* u ispitanica prema nepodudarnostima u pojedinim antigenima HPA.

Najučestaliji genotip je bio *HLA-DRB3*02/-*. Uz navedeni genotip, druga dva najučestalija genotipa bila su *HLA-DRB3*01/-* i *HLA-DRB3*02/DRB3*02*.

4.4.3. Geni *HLA-DRB4* i genotipovi *HLA-DRB4/DRB4* ispitanica s dokazanom nepodudarnošću u samo jednom antigenu HPA s novorođenčecom

U 39 od 108 ispitanica (36,1 %) uočen je jedan gen *HLA-DRB4* te dva genotipa *HLA-DRB4/DRB4* (Tablica 16.). Ukupno 36 (33,3 %) ispitanica imalo je samo jedan gen *HLA-DRB4*, dok je genotip *HLA-DRB4*01/DRB4*01* bio prisutan kod 3 (2,8 %) ispitanice.

U 69 (63,9 %) ispitanica gen *HLA DRB4* nije bio prisutan. U ispitanice s nepodudarnošću u antigenu HPA-1a geni *HLA-DRB4* nisu uočeni.

Tablica 16. Geni *HLA-DRB4* i genotipovi *HLA-DRB4/DRB4* ispitanica prema nepodudarnostima u jednom antigenu HPA (N=108)

Geni <i>HLA-DRB4*</i> (n; %)	Nepodudarnost u antigenima HPA						
	HPA-1b N=23, n (%)	HPA-2b N=10, n (%)	HPA-3a N=15, n (%)	HPA-3b N=15, n (%)	HPA-5b N=15, n (%)	HPA-15a N=20, n (%)	HPA-15b N=9, n (%)
<i>01</i> (n=42; 100,0)	9 (21,4)	6 (14,3)	6 (14,3)	6 (14,3)	5 (12,8)	4 (9,5)	6 (14,3)
Genotipovi <i>HLA-DRB4*/DRB4*</i> (n; %)	HPA-1b N=23, n (%)	HPA-2b N=10, n (%)	HPA-3a N=15, n (%)	HPA-3b N=15, n (%)	HPA-5b N=15, n (%)	HPA-15a N=20, n (%)	HPA-15b N=9, n (%)
<i>01/</i> (n=36; 92,3)	7 (19,4)	4 (11,1)	6 (16,7)	4 (11,1)	5 (13,9)	4 (11,1)	6 (16,7)
<i>01/01</i> (n=3; 7,7)	1 (33,3)	1 (33,3)	/	1 (33,3)	/	/	/

Kratice: N – broj ispitanica, n – broj uočenih gena *HLA-DRB4/* genotipova *HLA-DRB4/DRB4*

% – učestalost navedenih gena/genotipova, / – haplotip *HLA-DRB4* koji nije pozitivan za gen *HLA-DRB4*

U svih ispitanica s dokazanim genima *HLA-DRB4* uočeni su samo geni *HLA-DRB4*01*. Nije zamijećena značajna razlika u učestalosti gena *HLA-DRB4* u ispitanica prema pojedinim nepodudarnostima u antigenima HPA. Najučestaliji od uočenih genotipova bio je *HLA-DRB4*01/-*.

4.4.4. Geni *HLA-DRB5* i genotipovi *HLA-DRB5/DRB5* ispitanica s dokazanom nepodudarnošću u samo jednom antigenu HPA s novorođenčecom

Gen *HLA-DRB5* bio je prisutan kod 39 od 108 (36,1 %) ispitanica od kojih su 2 (1,8 %) ispitanice imale dva gena *HLA-DRB5* (Tablica 17.).

U 69 od 108 (63,9 %) ispitanica gen *HLA-DRB5* nije bio prisutan.

Tablica 17. Geni *HLA-DRB5* i genotipovi *HLA-DRB5/DRB5* ispitanica prema nepodudarnostima u jednom antigenu HPA (N=108)

Geni <i>HLA-DRB5</i> * (n; %)	Nepodudarnost u antigenima HPA						
	HPA-1b N=23, n (%)	HPA-2b N=10, n (%)	HPA-3a N=15, n (%)	HPA-3b N=15, n (%)	HPA-5b N=15, n (%)	HPA-15a N=20, n (%)	HPA-15b N=9, n (%)
01 (n=19; 47,5)	5 (26,3)	1 (5,2)	3 (15,8)	1 (5,2)	3 (15,8)	4 (21,1)	2 (10,5)
02 (n=21; 52,5)	4 (19,0)	2 (9,5)	3 (14,3)	4 (19,0)	2 (9,5)	6 (28,6)	/
Genotipovi <i>HLA-DRB5</i> */ <i>DRB5</i> * (n; %)	HPA-1b N=23, n (%)	HPA-2b N=10, n (%)	HPA-3a N=15, n (%)	HPA-3b N=15, n (%)	HPA-5b N=15, n (%)	HPA-15a N=20, n (%)	HPA-15b N=9, n (%)
01/- (n=18; 47,4)	4 (22,2)	1 (5,6)	3 (16,7)	1 (5,6)	3 (16,7)	4 (22,2)	2 (11,1)
01/02 (n=1; 2,6)	1 (100,0)	/	/	/	/	/	/
02/- (n=18; 47,4)	3 (16,7)	2 (11,1)	3 (16,7)	4 (22,2)	/	6 (33,3)	/
02/02 (n=1; 2,6)	/	/	/	/	1 (100,0)	/	/

Kratice: n – broj gena *HLA-DRB5*/ genotipova *HLA-DRB5/DRB5*, % – učestalost navedenih gena, / – haplotip *HLA-DRB5* koji nije pozitivan za gen *HLA-DRB5*

U ispitanica s dokazanim genima *HLA-DRB5*, geni *HLA-DRB5**01 i *HLA-DRB5**02 bili su podjednako učestali. Nije zamijećena značajna razlika u učestalosti gena *HLA-DRB5* u ispitanica prema pojedinim nepodudarnostima u antigenima HPA. Dva najučestalija genotipa bila su *HLA-DRB5**01/*DRB5**- i *HLA-DRB5**02/*DRB5**-.

4.5. Nepodudarnosti u antigenima ABO u parovima majka/novorodenče

Nepodudarnost u antigenima ABO u parovima majka/novorodenče prisutna je u slučajevima kada postoje majčina prirodna protutijela koja se mogu vezati na antigene ABO fetusa. Ukoliko je majka krvne grupe AB, prirodna protutijela anti-A i anti-B nisu prisutna u serumu majke te se nepodudarnost u antigenima ABO isključuje neovisno o krvnoj grupi novorođenčeta.

U 270 parova majka/novorodenče analizirane su nepodudarnosti u antigenima ABO. Tablica 18. prikazuje kriterije za utvrđivanje nepodudarnosti u antigenima ABO.

Tablica 18. Kriteriji za nepodudarnost u antigenima ABO u parovima majka/novorodenče

Nepodudarnost u antigenima ABO							
Krvna grupa	DA			NE			
majka	A	B	O	A	B	AB	O
novorođenče	B, AB	A, AB	A, B, AB	A, O	B, O	A, B, AB, O	O

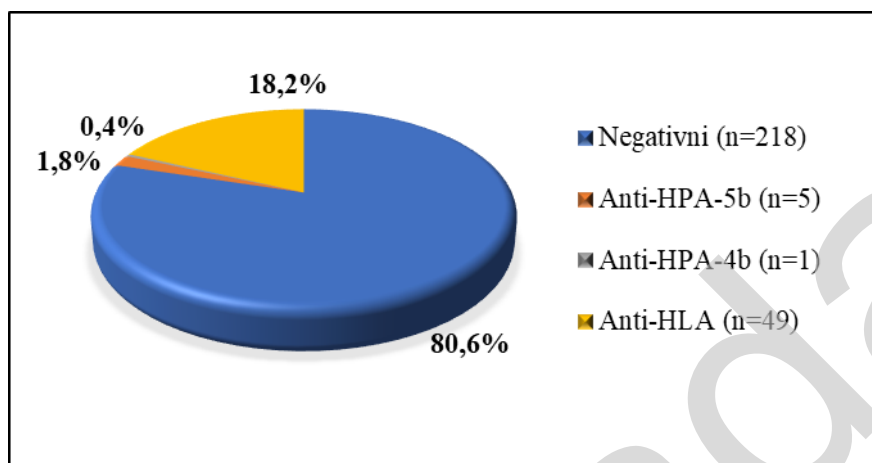
Od ukupno 270 parova majka/novorodenče, u 69 (25,6 %) parova dokazana je nepodudarnost u antigenima ABO, dok 201 (74,4 %) par nije ispunjavao kriterije za nepodudarnost u antigenima ABO.

4.6. Protutijela anti-HPA i anti-HLA u skupini ispitanica

4.6.1. Učestalost i specifičnost protutijela anti-HPA te učestalost protutijela anti-HLA u skupini ispitanica

Analizom rezultata imunohematološkog ispitivanja 270 ispitanica dokazano je da su 52 (19,3%) ispitanice u serumu imale prisutna protutijela anti-HPA i/ili anti-HLA. Učestalost protutijela anti-HLA bila je 18,2 %, a učestalost protutijela anti-HPA 2,2 %. Kod šest (2,2 %) ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA, naučestalija su bila protutijela anti-HPA-5b (1,8 %), dok je protutijelo anti-HPA-4b dokazano u jedne ispitanice.

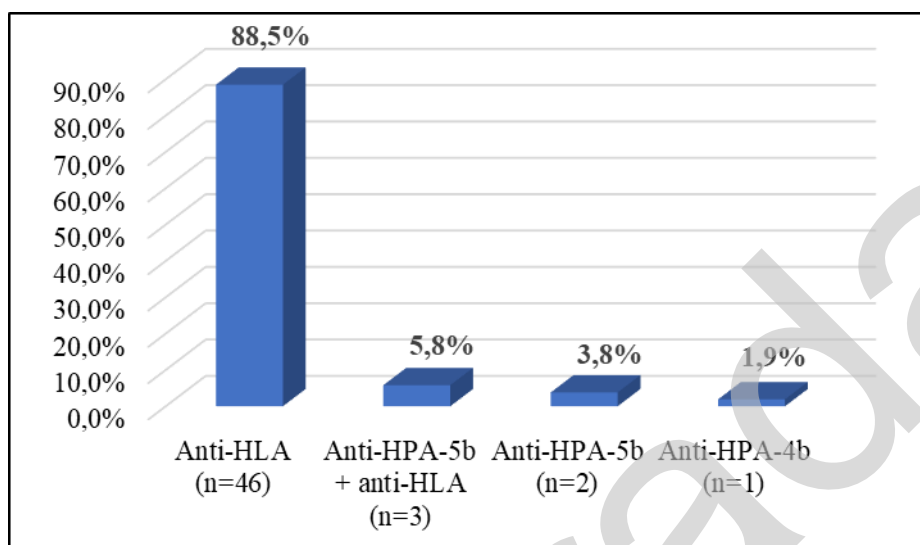
Učestalost i specifičnost protutijela anti-HPA te učestalost protutijela anti-HLA prikazana je na Slici 16.



Slika 16. Učestalost i specifičnost protutijela anti-HPA te učestalost protutijela anti-HLA u skupini ispitanica (N=270)

4.6.2. Kombinacije protutijela anti-HPA i anti-HLA u skupini ispitanica

Od ukupno 52 (19,3 %) ispitanice s dokazanim protutijelima anti-HPA i/ili anti-HLA, u 49 (94,2 %) ispitanica bila su prisutna ili protutijela anti-HPA ili protutijela anti-HLA, a u tri (5,8 %) ispitanice bila su prisutna istovremeno i protutijela anti-HPA i protutijela anti-HLA (Slika 17.).



Slika 17. Kombinacije protutijela anti-HPA i anti-HLA u skupini ispitanica (N=52)

Bilo je značajno više ispitanica s protutijelima anti-HLA u odnosu na sve ostale kombinacije (χ^2 test, **P<0,001**).

4.7. Geni *HLA-DRB1/3/4/5* i genotipovi *HLA-DRB1/DRB1*, *HLA-DRB3/DRB3*, *HLA-DRB4/DRB4* te *HLA-DRB5/DRB5* u skupini ispitanica s protutijelima anti-HPA

4.7.1. Geni *HLA-DRB1/3/4/5* u skupini ispitanica s protutijelima anti-HPA

U šest ispitanica s protutijelima anti-HPA uočeno je ukupno šest različitih gena *HLA-DRB1*, dva gena *HLA-DRB3* te po jedan gen *HLA-DRB4* i *HLA-DRB5* (Tablica 19.).

Tablica 19. Geni *HLA-DRB1/3/4/5* u skupini ispitanica s protutijelima anti-HPA (N=6)

Geni	Ispitanice s protutijelima anti-HPA	
	Anti-HPA-5b N=5 n (%)	Anti-HPA-4b N=1, n (%)
<i>HLA-DRB1*</i> (n; %)		
<i>01</i> (n=1; 8,3)	/	1 (100,0)
<i>04</i> (n=4; 33,3)	3 (75,0)	1 (25,0)
<i>07</i> (n=1; 8,3)	1 (100,0)	/
<i>11</i> (n=3; 25,0)	3 (100,0)	/
<i>13</i> (n=2; 16,7)	2 (100,0)	/
<i>15</i> (n=1; 8,3)	1 (100,0)	/
<i>HLA-DRB3*</i> (n; %)		
<i>01</i> (n=1; 25,0)	1 (100,0)	/
<i>02</i> (n=3; 75,0)	3 (100,0)	/
<i>HLA-DRB4*</i> (n; %)		
<i>01</i> (n=5; 100,0)	4 (80,0)	1 (20,0)
<i>HLA-DRB5*</i> (n; %)		
<i>01</i> (n=1; 100,0)	1 (100,0)	/

Kratice: N – broj ispitanica, n – broj uočenih gena *HLA-DRB1/3/4/5*, % – učestalost navedenih gena

Nije zamijećena značajna razlika u učestalosti gena *HLA-DRB1/3/4/5* između ispitanica s pojedinim nepodudarnostima u antigenima HPA bez protutijela anti-HPA i ispitanica s prisutnim protutijelima anti-HPA te između ispitanica s prisutnim protutijelima anti-HPA s obzirom na specifičnost protutijela (anti-HPA-5b i -4b).

4.7.2. Genotipovi *HLA-DRB1/DRB1*, *HLA-DRB3/DRB3*, *HLA-DRB4/DRB4* i *HLA-DRB5/DRB5* u skupini ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA

Među ispitanicama s dokazanim protutijelima anti-HPA uočeno je ukupno 5 različitih genotipova *HLA-DRB1/DRB1*, dva genotipa *HLA-DRB3/DRB3* te po jedan genotip *HLA-DRB4/DRB4* i *HLA-DRB5/DRB5* (Tablica 20.).

Tablica 20. Genotipovi *HLA-DRB1/DRB1*, *HLA-DRB3/DRB3*, *HLA-DRB4/DRB4* te *HLA-DRB5/DRB5* ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA (N=6)

Genotipovi <i>HLA-DRB1*/DRB1*</i> (n; %)	Ispitanice s protutijelima anti-HPA	
	Anti-HPA-5b N=5 n (%)	Anti-HPA-4b N=1, n (%)
<i>01/04</i> (n=1; 16,7)	/	1 (100,0)
<i>04/11</i> (n=1; 16,7)	1 (100,0)	/
<i>04/13</i> (n=2; 33,3)	2 (100,0)	/
<i>07/15</i> (n=1; 16,7)	1 (100,0)	/
<i>11/11</i> (n=1; 16,7)	1 (100,0)	/
<i>HLA-DRB*3/DRB3*</i> (n; %)	Anti-HPA-5b N=5, n (%)	Anti-HPA-4b N=1, n (%)
<i>01/-</i> (n=1, 25,0)	1 (100,0)	/
<i>02/-</i> (n=3; 75,0)	3 (100,0)	/
<i>HLA-DRB4*/DRB4*</i> (n; %)	Anti-HPA-5b N=5, n (%)	Anti-HPA-4b N=1, n (%)
<i>01/-</i> (n=5; 100,0)	4 (80,0)	1 (20,0)
<i>HLA-DRB5*/DRB5*</i> (n; %)	Anti-HPA-5b N=5, n (%)	Anti-HPA-4b N=1, n (%)
<i>01/-</i> (n=1; 100,0)	1 (100,0)	/

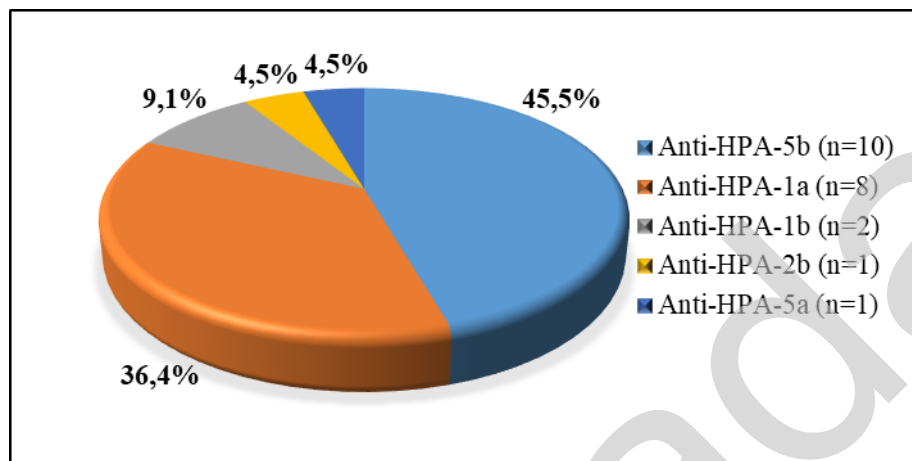
Kratice: N – broj ispitanica, n – broj uočenih genotipova *HLA-DRB1/DRB1*, *HLA-DRB3/DRB3*, *HLA-DRB4/DRB4* i *HLA-DRB5/DRB5*, % – učestalost navedenih genotipova, / – haplotip koji nije pozitivan za gen *HLA-DRB1/3/4/5*

4.8. Protutijela anti-HPA ispitanica čija novorođenčadi je imala FNAIT

4.8.1. Učestalost i specifičnost protutijela anti-HPA u skupini ispitanica čija novorođenčad je imala FNAIT

Imunohematološka ispitivanja protutijelima anti-HPA u skupini ispitanica čija je novorođenčadi imala FNAIT (N=22) pokazala su prisutnost pet protutijela anti-HPA različite specifičnosti.

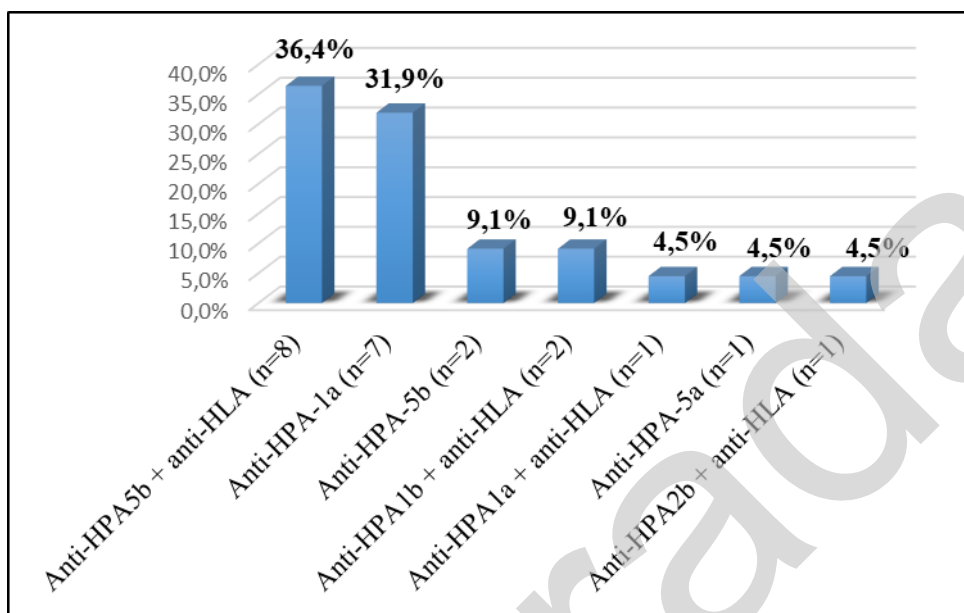
Najučestalija su bila protutijela anti-HPA-5b iza kojih po učestalosti slijede protutijela anti-HPA-1a (Slika 18.). Protutijela anti-HPA-2b i -5a u navedenoj skupini utvrđena su u jedne, a protutijela anti-HPA-1b u dvije ispitanice.



Slika 18. Učestalost i specifičnost protutijela anti-HPA u skupini ispitanica čija novorođenčad je imala FNAIT (N=22)

4.8.2. Kombinacije protutijela anti-HPA i anti-HLA u skupini ispitanica čija je novorođenčadi imala FNAIT

Kod 12 (54,5%) ispitanica s protutijelima anti-HPA u serumu su dokazana i protutijela anti-HLA. Na Slici 19. prikazane su kombinacije protutijela anti-HPA i anti-HLA. Najveća učestalost protutijela anti-HLA dokazana je u ispitanica s protutijelima anti-HPA-5b. Značajno je više majki s protutijelima anti-HPA-1a i -5b + HLA u odnosu na ostale (χ^2 test, $P=0,020$).



Slika 19. Kombinacije protutijela anti-HPA i anti-HLA (N=22)

4.9. Geni *HLA-DRB1/3/4/5* i genotipovi *HLA-DRB1/DRB1*, *HLA-DRB3/DRB3*, *HLA-DRB4/DRB4* i *HLA-DRB5/DRB5* u skupini ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA čija novorođenčad je imala FNAIT

4.9.1. Geni *HLA-DRB1/3/4/5* u skupini ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA čija novorođenčad je imala FNAIT

U 22 ispitanice s protutijelima anti-HPA uočeno je 9 različitih gena *HLA-DRB1*, tri gena *HLA-DRB3*, jedan gen *HLA-DRB4* i jedan gen *HLA-DRB5* (Tablica 21.).

Tablica 21. Geni *HLA-DRB1/3/4/5* u ispitanica s protutijelima anti-HPA čija novorođenčad je imala FNAIT (N=22)

Geni	Ispitanice s protutijelima anti-HPA				
	Anti-HPA-1a N=8 n (%)	Anti-HPA-1b N=2 n (%)	Anti-HPA-2b N=1 n (%)	Anti-HPA-5a N=1 n (%)	Anti-HPA-5b N=10 n (%)
<i>HLA-DRB1*</i> (n; %)					
<i>01</i> (n=4; 9,1)	1 (25,0)	1 (25,0)	/	/	2 (50,0)
<i>03</i> (n=7; 15,9)	5 (71,4)	1 (14,3)	/	/	1 (14,3)
<i>04</i> (n=2; 4,5)	1 (50,0)	/	/	/	1 (50,0)
<i>07</i> (n=5; 11,4)	3 (60,0)	/	/	1 (20,0)	1 (20,0)
<i>08</i> (n=2; 4,5)	/	/	/	/	2 (100,0)
<i>11</i> (n=5; 11,4)	/	/	1 (20,0)	/	4 (80,0)
<i>13</i> (n=10; 22,7)	4 (40,0)	1 (10,0)	/	1 (10,0)	4 (40,0)
<i>14</i> (n=3; 6,8)	1 (33,3)	/	/	/	2 (66,7)
<i>16</i> (n=6; 13,6)	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	/	3 (50,0)
<i>HLA-DRB3*</i> (n; %)					
<i>01</i> (n=12; 48,0)	9 (75,0)	1 (8,3)	/	1 (8,3)	1 (8,3)
<i>02</i> (n=11; 44,0)	1 (9,1)	1 (9,1)	1 (9,1)	/	8 (72,7)
<i>03</i> (n=2; 8,0)	/	/	/	/	2 (100,0)
<i>HLA-DRB4*</i> (n; %)					
<i>01</i> (n=7; 100,0)	4 (57,1)	/	/	1 (14,3)	2 (28,6)
<i>HLA-DRB5*</i> (n; %)					
<i>02</i> (n=6; 100,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	/	3 (50,0)

Kratice: N – broj ispitanica, n – broj uočenih gena *HLA-DRB1/3/4/5*, % - učestalost navedenih gena

Među genima *HLA-DRB1* najučestaliji je bio *HLA-DRB1*13*. U skupini ispitanica s protutijelima anti-HPA (N=22) navedeni gen bio je dokazan u devet (40,9 %) ispitanica; osam od njih bile su heterozigoti, a jedna homozigot za navedeni gen, dok je u skupini ispitanica s dokazanom nepodudarnosti u antigenima HPA s novorođenčetom bez protutijela anti-HPA (N=104) navedeni gen bio dokazan u 20 ispitanica (18 heterozigota i dva homozigota), iz čega proizlazi da je u navedenoj skupini *HLA-DRB1*13* bio statistički značajno manje prisutan (19,2 %; χ^2 test, $P=0,048$). Za istaknuti je još gen *HLA-DRB1*15* (nije prikazan u tablici) koji nije uočen niti u jedne ispitanice s protutijelima anti-HPA, dok je bio prisutan u 19 ispitanica s protutijelima (heterozigoti) te je u navedenoj skupini bio statistički značajno prisutniji (18,3 %; χ^2 test, $P=0,043$). Za preostale gene *HLA-DRB1* navedene u Tablici 21. nije dokazana statistički značajna razlika između dvije skupine ($P>0,05$).

Geni *HLA-DRB3*01* bili su prisutni u 11 (50,0 %) ispitanica s protutijelima anti-HPA (10 heterozigota i jedan homozigot), dok su navedeni geni u skupini ispitanica bez protutijela anti-HPA uočeni u 21 ispitanice (19 heterozigota i dva homozigota), iz čega proizlazi da je gen *HLA-DRB3*01* u navedenoj skupini bio statistički značajno prisutniji nego u skupini ispitanica bez protutijela (20,2 %; χ^2 test, $P=0,006$).

Nadalje, geni *HLA-DRB3*02* uočeni su u 10 (40,9 %) ispitanica s protutijelima anti-HPA (devet heterozigota i jedan homozigot), dok su u skupini ispitanica bez protutijela anti-HPA bili prisutni u 54 (51,9 %) ispitanice (43 heterozigota i 11 homozigota). Za razliku od gena *HLA-DRB3*01*, za gen *HLA-DRB3*02* nije dokazana statistički značajna razlika među navedenim skupinama ($P>0,05$).

Gen *HLA-DRB4*01* uočen je u sedam (31,8 %) ispitanica s protutijelima anti-HPA (heterozigoti) i u 32 (32,7 %) ispitanice bez protutijela (29 heterozigota i tri homozigota), razlika nije bila statistički značajna.

Gen *HLA-DRB5*02* bio je prisutan u šest (27,3 %) ispitanica s protutijelima anti-HPA (heterozigoti) i u 20 (19,2 %) ispitanica bez protutijela anti-HPA (19 heterozigota i jedan homozigot). Za navedeni gen nije dokazana statistički značajna razlika u raspodjeli između navedenih skupina ($P<0,05$). Suprotno tome, gen *HLA-DRB5*01* nije uočen niti u jedne ispitanice u skupini ispitanica s protutijelima anti-HPA, dok je u skupini ispitanica bez protutijela dokazan u 18 ispitanica (heterozigoti) te je u navedenoj skupini bio statistički značajno učestaliji nego u ispitanica s protutijelima (17,3 %; χ^2 test, $P=0,041$).

4.9.2. Genotipovi *HLA-DRB1/DRB1*, *HLA-DRB3/DRB3*, *HLA-DRB4/DRB4* i *HLA-DRB5/DRB5* ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA čija novorođenčad je imala FNAIT

Petnaest različitih genotipova *HLA-DRB1/DRB1* prikazanih u Tablici 22. bilo je prisutno u skupini ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA čija je novorođenčad imala FNAIT (N=22); dva različita genotipa uočena su u tri, odnosno dvije ispitanice.

Dva ista genotipa *HLA-DRB1*/DRB1** imale su po tri ispitanice, a tri ista genotipa po dvije ispitanice.

Tablica 22. Genotipovi *HLA-DRB1/DRB1* ispitanica s protutijelima anti-HPA čija novorođenčad je imala FNAIT (N=22)

Genotipovi	Ispitanice s protutijelima anti-HPA				
	Anti- HPA-1a N=8 n (%)	Anti- HPA-1b N=2 n (%)	Anti- HPA-2b N=1 n (%)	Anti- HPA-5a N=1 n (%)	Anti- HPA-5b N=10 n (%)
01/03 (n=3; 13,6)	1 (33,3)	1 (33,3)	/	/	1 (33,3)
01/14 (n=1; 4,5)	/	/	/	/	1 (100,0)
03/04 (n=1; 4,5)	1 (100,0)	/	/	/	/
03/07 (n=2; 9,1)	2 (100,0)	/	/	/	/
03/13 (n=1; 4,5)	1 (100,0)	/	/	/	/
04/13 (n=1; 4,5)	/	/	/	/	1 (100,0)
07/13 (n=2; 9,1)	1 (50,0)	/	/	1 (50,0)	/
07/14 (n=1; 4,5)	/	/	/	/	1 (100,0)
08/13 (n=1; 4,5)	/	/	/	/	1 (100,0)
08/16 (n=1; 4,5)	/	/	/	/	1 (100,0)
11/11 (n=1; 4,5)	/	/	/	/	1 (100,0)
11/16 n=3; 13,6)	/	/	1 (33,3)	/	2 (66,7)
13/13 (n=1; 4,5)	/	/	/	/	1 (100,0)
13/14 (n=1; 4,5)	1 (100,0)	/	/	/	/
13/16 (n=2; 9,1)	1 (50,0)	1 (50,0)	/	/	/

Kratice: N – broj ispitanica, n – broj uočenih genotipova *HLA-DRB1/DRB1*, % - učestalost navedenih genotipova

U 21 (95,5 %) ispitanice bili su prisutni geni *HLA-DRB3*, u sedam (31,8 %) ispitanica geni *HLA-DRB4* te u šest (27,3 %) ispitanica geni *HLA-DRB5*. Raspodjela uočenih genotipova *HLA-DRB3/DRB3*, *HLA-DRB4/DRB4* i *HLA-DRB5/DRB5* prikazana je u Tablici 23.

Tablica 23. Genotipovi *HLA-DRB3/DRB3*, *HLA-DRB4/DRB4* i *HLA-DRB5/DRB5* ispitanica čija novorođenčad je imala FNAIT (N=22)

Genotipovi	Ispitanice s protutijelima anti-HPA				
	Anti-HPA-1a N=8 n (%)	Anti-HPA-1b N=2 n (%)	Anti-HPA-2b N=1 n (%)	Anti-HPA-5a N=1 n (%)	Anti-HPA-5b N=10 n (%)
<i>HLA-DRB3*/DRB3*</i> (n; %)					
<i>01/-</i> (n=9; 42,9)	6 (66,7)	1 (11,1)	/	1 (11,1)	1 (11,1)
<i>01/01</i> (n=1; 4,8)	1 (100,0)	/	/	/	/
<i>01/02</i> (n=1; 4,8)	1 (100,0)	/	/	/	/
<i>02/-</i> (n=7; 33,3)	/	1 (14,3)	1 (14,3)	/	5 (71,4)
<i>02/02</i> (n=1; 4,8)	/	/	/	/	1 (100,0)
<i>02/03</i> (n=1; 4,8)	/	/	/	/	1 (100,0)
<i>03/-</i> (n=1; 4,8)	/	/	/	/	1 (100,0)
<i>HLA-DRB4*/DRB4*</i> (n; %)					
<i>01/-</i> (n=7, 100,0)	4 (57,1)	/	/	1 (14,3)	2 (28,6)
<i>HLA-DRB5*/DRB5*</i> (n; %)					
<i>02/-</i> (n=6; 100,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	/	3 (50,0)

Kratice: N – broj ispitanica, n – broj uočenih genotipova *HLA-DRB3/DRB3*, *HLA-DRB4/DRB4* i *HLA-DRB5/DRB5*, % – učestalost navedenih genotipova, / – haplotip koji nije pozitivan za gen *HLA-DRB3/4/5*

Uočeno je ukupno sedam genotipova *HLA-DRB3/DRB3*; dva najučestalija bila su *HLA-DRB3*01/-* i *HLA-DRB3*02/-*. U ispitanica s prisutnim genima *HLA-DRB4* i *HLA-DRB5* uočen je po jedan genotip *HLA-DRB4*01/-* i *HLA-DRB5*02/-*.

4.10. Povezanost pojedinih alela *HLA-DRB1/3/4/5* i fetomaternalne aloimunizacije ispitanica na antigene HPA

Osim na razini gena HLA, analizirani su i aleli *HLA-DRB1/3/4/5* u skupini ispitanica s protutijelima anti-HPA čija je novorođenčad imala FNAIT (N=22) te u skupini ispitanica s nepodudarnošću u jednom antigenu HPA, bez protutijela anti-HPA (N=104) (Tablica 24.).

Tablica 24. Povezanost pojedinih alela *HLA-DRB1/3/4/5* i učestalosti protutijela anti-HPA u ispitanica (N=126)

Aleli	Protutijela anti-HPA		
	POZ n=22 (%)	NEG n=104 (%)	P
HLA-DRB1*			
<i>13:01</i>	8 (36,4)	15 (14,4)	0,029
<i>13:02</i>	2 (9,1)	9 (8,7)	0,312
<i>15:01</i>	0 (0,0)	16 (15,4)	0,037
<i>15:02</i>	0 (0,0)	2 (1,9)	>0,99
HLA-DRB3*			P*
<i>01:01</i>	11 (50,0)	21 (20,2)	0,006
<i>02:02</i>	10 (45,5)	55 (52,9)	0,640
<i>03:01</i>	2 (9,1)	9 (8,7)	>0,99
HLA-DRB4*			P*
<i>01:01</i>	3 (13,6)	12 (11,5)	0,725
<i>01:03</i>	4 (18,2)	24 (23,1)	0,780
HLA-DRB5*			P
<i>01:01</i>	0 (0,0)	16 (15,4)	0,037
<i>02:02</i>	6 (27,3)	18 (17,3)	0,368

Kratice: n (%) – broj i učestalost ispitanica, P – P vrijednost, Fisherov egzakti test

Alel *HLA-DRB1*13:01* uočen je u 36,4 % ispitanica s protutijelima anti-HPA, dok je njegova učestalost u skupini od 104 ispitanice bez protutijela bila statistički značajno niža (14,4 %; χ^2 test, $P=0,029$). Kod 22 ispitanice s protutijelima anti-HPA, alel *HLA-DRB1*15:01* nije uočen niti kod jedne ispitanice, dok je u skupini ispitanica bez protutijela anti-HPA navedeni alel bio statistički značajno prisutniji (15,4 %; χ^2 test, $P=0,037$).

Nadalje, alel *HLA-DRB3*01:01* uočen je u 50,0 % ispitanica s protutijelima anti-HPA, dok je njegova učestalost u skupini ispitanica bez protutijela bila statistički značajno niža (20,2 %; χ^2 test, $P=0,006$).

Niti za jedan od dva alela *HLA-DRB4* (*HLA-DRB4*01:01* i *HLA-DRB4*01:03*) nije dokazana statistički značajna razlika u raspodjeli između navedenih skupina ispitanica, odnosno nije dokazana povezanost s fetomaterialnom aloimunizacijom ispitanica, na antigene HPA ($P<0,05$).

Alel *HLA-DRB5*01:01* nije uočen niti u jedne ispitanice s protutijelima anti-HPA, dok je navedeni alel među ispitanicama bez protutijela bio statistički značajno viši (15,4 %; χ^2 test, $P=0,037$). Za razliku od navedenog alela, za alel *HLA-DRB5*02:02* nije dokazana statistički značajna razlika u raspodjeli između navedenih skupina ispitanica ($P<0,05$).

4.11. Povezanost nepodudarnosti u antigenima HPA u skupini parova majka/novorodenče i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA i HLA

Za protutijela anti-HPA i anti-HLA nema značajnih razlika u raspodjeli prema nepodudarnosti u antigenima HPA u ispitivanim skupinama (N=270) (Tablica 25.).

Tablica 25. Povezanost nepodudarnosti u antigenima HPA u skupini parova majka/novorodenče i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA i HLA (N=270)

Protutijela anti-HPA /anti-HLA		Nepodudarnost u antigenima HPA		
		NE n=114 (%)	DA n=156 (%)	P
Anti-HPA	NEG	113 (99,1)	151 (96,8)	0,197
	POZ	1 (0,9)	5 (3,2)	
Anti-HLA	NEG	93 (81,6)	128 (82,1)	> 0,99
	POZ	21 (18,4)	28 (17,9)	

Kratice: n (%) – broj i učestalost ispitanica, P – P vrijednost, Fisherov egzaktni test

4.12. Povezanost nepodudarnosti u antigenima ABO u skupini parova majka/novorodenče i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA i HLA

Učestalost anti-HLA protutijela u skupini od 69 ispitanica koje su bile nepodudarne u jednom, dva, tri ili četiri antigena ABO s novorođenčetom bila je 27,5 %, dok je taj postotak u skupini od 201 ispitanice bez nepodudarnosti u antigenima ABO bio statistički značajno niži (14,9 %; χ^2 test, $P = 0,029$) (Tablica 26.).

Za protutijela anti-HPA nije dokazana značajna razlika u raspodjeli između navedenih skupina.

Tablica 26. Povezanost nepodudarnosti u antigenima ABO u skupini parova majka/novorodence i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA i HLA (N=270)

Protutijela anti-HLA/anti-HPA		Nepodudarnost u antigenima ABO		
		DA n=69 (%)	NE n=201 (%)	P
Anti-HLA	NEG	50 (72,5)	171 (85,1)	0,029
	POZ	19 (27,5)	30 (14,9)	
Anti-HPA	NEG	68 (98,6)	196 (97,5)	> 0,99
	POZ	1 (1,4)	5 (2,5)	

Kratice: n (%) – broj i učestalost ispitanica, P – P vrijednost, Fisherov egzaktni test

4.13. Povezanost ABO krvne grupe u skupini ispitanica i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA i HLA

Za protutijela anti-HPA te protutijela anti-HLA nije bilo značajnih razlika u raspodjeli prema ABO krvnoj grupi ispitanica (Tablica 27.).

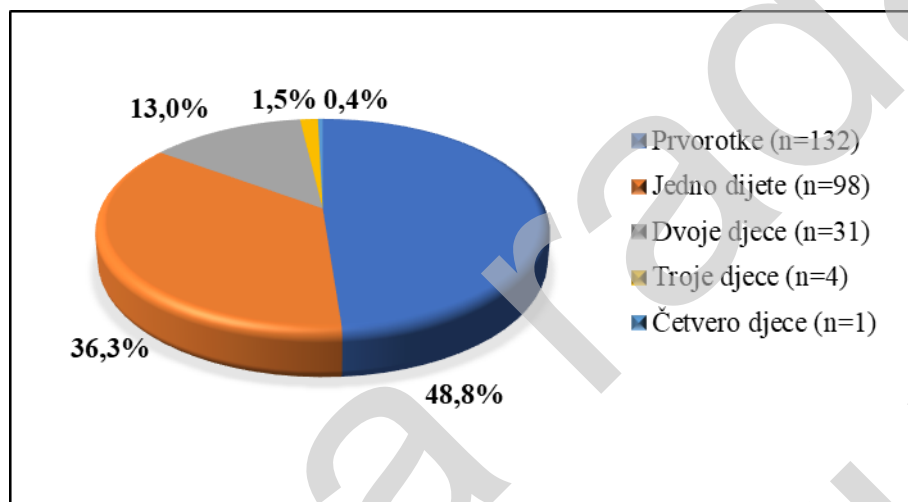
Tablica 27. Povezanost ABO krvne grupe u skupini ispitanica i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA i HLA novorođenčeta (N=270)

ABO krvna grupa	Anti-HPA			Anti-HLA		
	NEG n=264 (%)	POZ n=6 (%)	P	NEG n=221 (%)	POZ n=49 (%)	P
A	96 (36,4)	2 (33,3)	0,388	77 (34,8)	21 (42,0)	0,662
B	53 (20,1)	1(16,7)		44 (19,9)	10 (20,0)	
O	97 (36,7)	0 (0,0)		83 (37,6)	17 (34,0)	
AB	18 (6,8)	3 (50,0)		17 (7,7)	2 (4,0)	

Kratice: n (%) – broj i učestalost ispitanica, P – P vrijednost, Fisherov egzaktni test

4.14. Povezanost broja poroda ispitanica i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA i HLA

U istraživanju se bilježio i broj prethodnih poroda u skupini ispitanica (N=270) te su ispitanice u najvećem broju (48,8 %) bile prvoročke (Slika 20.).



Slika 20. Učestalost prethodnih poroda u ispitanica (N=270)

Po učestalosti iza prvoročke slijede ispitanice koje su prethodno rodile samo jedno dijete te potom ispitanice s dvoje, troje i četvero prethodno rođene djece.

Tablica 28. prikazuje povezanost broja poroda i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA/HLA za prvoročke i višerotke. Zbog malog broja (Slika 20.) ispitanice s troje i četvero djece nisu prikazane u tablici.

Iako je učestalost protutijela anti-HLA u ispitanica rasla razmjerno s brojem poroda, nije dokazana statistički značajna razlika u učestalosti protutijela u navedenim skupinama.

Za protutijela anti-HPA također nije bilo značajnih razlika u raspodjeli prema broju poroda ispitanica.

Tablica 28. Povezanost prethodnih poroda i učestalosti protutijela anti-HPA/anti-HLA u svih ispitanica (N=270)

Protutijela anti-HPA/anti-HLA		Broj poroda			
		NULA n=132 (%)	JEDAN n=98 (%)	DVA n=35 (%)	P
Anti-HPA	NEG	128 (97,0)	96 (98,0)	35 (100,0)	0,863
	POZ	4 (3,0)	2 (2,0)	0 (0,0)	
Anti-HLA	NEG	109 (82,6)	80 (81,6)	28 (80,0)	0,903
	POZ	23 (17,4)	18 (18,4)	7 (20,0)	

Kratice: n (%) – broj i učestalost ispitanica, P – P vrijednost, Fisherov egzaktni test

4.15. Povezanost protutijela anti-HLA u skupini ispitanica i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA

Učestalost protutijela anti-HLA protutijela u skupini od 22 ispitanice s protutijelima anti-HPA bila je 54,5 %, dok je taj postotak u skupini od 104 ispitanice bez protutijela bio statistički značajno niži (%; χ^2 test, $P < 0,001$) (Tablica 29.).

Tablica 29. Povezanost protutijela anti-HLA u skupini ispitanica i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA i HLA (N=126)

Protutijela anti-HLA	Protutijela anti-HPA		P
	POZ n=22 (%)	NEG n=104 (%)	
POZ	12 (54,5)	14 (13,5)	< 0,001
NEG	10 (45,5)	90 (86,5)	

Kratice: n (%) – broj i učestalost ispitanica, P – P vrijednost, Fisherov egzaktni test

4.16. Povezanost alela *HLA-DRB3*01:01* i učestalosti protutijela anti-HPA-1a te alela *HLA-DRB3*02:02* i učestalosti protutijela anti-HPA-5b u skupini ispitanica čija su djeca imala FNAIT

Među ispitanicama s protutijelima anti-HPA-1a te s protutijelima anti-HPA-5b čija su djeca imala FNAIT (N=18), ispitana je povezanost s pojedinim alelima gena *HLA-DRB3* (Tablica 30.).

Tablica 30. Povezanost alela *HLA-DRB3*01:01* / *HLA-DRB3*02:02* i učestalosti protutijela anti-HPA-1a/-5b u ispitanica čija novorođenčad je imala FNAIT (N=18)

Aleli <i>HLA-DRB3*</i>	Protutijela anti-HPA		
	Anti-HPA-1a n=8 (%)	Anti-HPA-5b n=10 (%)	P
<i>01:01</i>	8 (100,0)	1 (10,0)	< 0,001
<i>02:02</i>	1 (12,5)	7 (70,0)	0,025

Kratice: n (%) – broj i učestalost ispitanica, P – P vrijednost, Fisherov egzaktni test

U skupini od 8 ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA-1a bilo je više ispitanica s uočenim alelima *HLA-DRB3*01:01* (100,0 %), dok je taj postotak u skupini ispitanica s protutijelima anti-HPA-5b bio statistički značajno niži (10,0 %; χ^2 test, P < 0,001).

U skupini od 8 ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA-1a, alel *HLA-DRB3*02:02* uočen je u jedne ispitanice (12,5 %), dok je taj postotak u skupini ispitanica s protutijelima anti-HPA-5b bio statistički značajno viši (70,0 %; χ^2 test, P=0,025).

4.17. Povezanost učestalosti protutijela anti-HPA-1a/-5b i protutijela anti-HLA u ispitanica

U skupini od 18 ispitanica s protutijelima anti-HPA, u devet (50,0 %) ispitanica bila su istovremeno prisutna i protutijela anti-HLA (Tablica 31.).

Među ispitanicama s protutijelima anti-HPA-5b, u osam (80,0 %) ispitanica bila su prisutna protutijela anti-HLA, dok je taj postotak u skupini ispitanica s protutijelima anti-HPA-1a bio statistički značajno niži (12,5 %) (χ^2 test, P=0,015).

Tablica 31. Povezanost učestalosti protutijela anti-HPA-1a/-5b i protutijela anti-HLA (N=18)

Protutijela anti-HLA	Protutijela anti-HPA		
	Anti-HPA-1a n=8 (%)	Anti-HPA-5b n=10 (%)	P
POZ	1 (12,5)	8 (80,0)	0,015
NEG	7 (87,5)	2 (20,0)	

Kratice: n (%) – broj i učestalost ispitanica, P – P vrijednost, Fisherov egzakti test

5. RASPRAVA

5.1. Usporedba rezultata raspodjele alela HPA s drugim populacijama

Prvi cilj ovog istraživanja bio je odrediti alele i genotipove gena *HPA-1*, *-2*, *-3*, *-4*, *-5*, *-6*, *-7*, *-8*, *-9*, *-11* i *-15* te genotip HPA u skupini ispitanica i novorođenčadi. Za usporedbu raspodjele alela HPA između ispitanica, novorođenčadi i drugih populacija odabrano je 25 država svijeta te tri područja koja su specifična za izolirane populacije poput područja Australije (populacija Aboriđina), Subsaharske Afrike (populacija Pigmejaca) i Amazonije (populacija Indijanaca). Učestalosti alela *HPA-1*, *-2*, *-3*, *-4*, *-5*, *-6*, *-9* i *-15* u Hrvatskoj (ispitanice i novorođenčad) i u ostalim populacijama Europe i svijeta prikazane su u Prilozima 1. i 2.

Slična istraživanja učestalosti gena HPA provedena su i u nekim državama koje graniče ili se nalaze u neposrednoj blizini Hrvatske, naprimjer u Sloveniji, Srbiji i Makedoniji^{15,17,28}. Raspodjela alela *a* i *b* za navedene gene HPA bila je podjednaka u navedenim populacijama, s izuzetkom nešto niže učestalosti alela *HPA-5b* u populaciji Slovenije¹⁵ (Prilog 1.). Nadalje, najmanja učestalost alela *HPA-1b* i *-2b* od svih 12 populacija zabilježena je u populaciji Norveške²⁹, alela *HPA-3b* u populaciji Švicarske³⁰, alela *HPA-5b* u populaciji Finske³¹ te alela *HPA-15b* u populaciji Njemačke³². Navedena istraživanja upućuju na pad učestalosti gena *HPA-1b*, *-2b* i *-5b* od sjevera prema jugu Europe. Usporedbom rezultata učestalosti gena HPA navedenih populacija Europe s rezultatima ovog istraživanja dokazana je podjednaka raspodjela alela gena HPA ($p > 0,05$), uz izuzetak populacije Finske za koju je zabilježena statistički značajna razlika u učestalosti alela *HPA-5b* u usporedbi s rezultatima učestalosti alela *HPA-5b* u ovom istraživanju (**P=0,002**). Potrebno je provesti opsežnija i detaljnija istraživanja kako bi se dobila cjelovita i objektivna slika učestalosti gena HPA.

Za razliku od navedenih populacija Europe, raspodjela alela *a* i *b* za gene *HPA-1*, *-2*, *-3*, *-4*, *-5*, *-6*, *-9* i *-15* u ovom istraživanju razlikuje se u usporedbi s populacijama svijeta (Prilog 2.). Primjerice, u usporedbi s ovim istraživanjem, veća je učestalost alela *HPA-1b* dokazana u sjevernoj Africi (Tunis)³⁷ i na Bliskom Istoku (Bahrein)²⁶ s najvećom učestalošću u populaciji Maroka¹⁸. Manja učestalost alela *HPA-1b* od učestalosti alela *HPA-1b* u populaciji Hrvatske bila je prisutna u populacijama Azije (Japan, Kina)^{20,23}, Subsaharske Afrike (populacija Pigmejaca)²², Amazonije (populacija Indijanaca)³⁸ te Australije (populacija Aboriđina)³⁹. Najveća učestalost alela *HPA-2b* zabilježena je u populaciji Pigmejaca²², iza koje slijede populacije sjeverne Afrike (Maroko)¹⁸, Subsaharske Afrike²² te Bliskog Istoka (Bahrein,

Saudijska Arabija,)^{26,40}. Navedene populacije imale su veću učestalost alela *HPA-2b* od učestalosti navedenog alela u ovom radu, dok su manju učestalost imale populacije Azije (Kina, Burma, Vijetnam)^{23,24,41}, Australije (Aboriđini)³⁹ i Amazonije (Indijanci)³⁸.

Jedina dva područja svijeta koja su odstupala u raspodjeli alela *HPA-3b* od ostalih populacija svijeta bila su Tunis³⁷ i Australija (populacija Aboriđina)³⁹. U navedena dva područja učestalost alela *HPA-3b* bila je znatno manja u usporedbi s ostalim populacijama svijeta.

S obzirom na to da se u svijetu antigen *HPA-4b* ubraja u antigene vrlo niske učestalosti, u ovom istraživanju alel *HPA-4b*, očekivano, nije uočen u skupini ispitanica, dok je u skupini novorođenčadi uočen samo jednom (0,2 %), što je također usporedivo s objavljenim rezultatima istraživanja na području Europe i svijeta. Područja u kojima je uočen alel *HPA-4b* su Azija (Japan, Burma, Južna Koreja)^{20,24,42} i Bliski Istok (Saudijska Arabija)⁴⁰, dok je populacija Bahreina imala najveću zabilježenu učestalost alela *HPA-4b* u svijetu (0,07 %)²⁶.

Učestalost alela *HPA-5b* u ovom radu usporediva je s rezultatima istraživanja koja obuhvaćaju populacije Europe, uz iznimku Finske koja ima nešto manju učestalost navedenog alela. Veća učestalost alela *HPA-5b* zabilježena je u sjevernoj Africi (Maroko, Tunis, Egipat)^{18,37,43}, Subsaharskoj Africi (populacija Konga)²², Australiji (Aboriđini)³⁹ te na Bliskom Istoku (Saudijska Arabija)⁴⁰, s najvećom učestalošću, slično kao i za alel *HPA-2b* uočenom u populaciji Pigmejaca²². Manja učestalost navedenog alela zabilježena je u populacijama Azije (Kina, Burma)^{23,24}.

Alel *HPA-6b* nije uočen u ovoj ispitivanoj skupini, što odgovara objavljenim podacima. Nešto veća učestalost navedenog alela zabilježena je u Europi samo u populaciji Finske³¹ te u Japanu²⁰.

Alel *HPA-9b* također je rijedak u populacijama; u ovom istraživanju uočen je u 0,6 % ispitanica te u 0,2 % novorođenčadi.

Aleli *HPA-15a* i *-15b* podjednako su zastupljeni u populacijama svijeta. Izuzetak je Subsaharska Afrika koja ima najmanju učestalost alela *HPA-15b* od svih istraživanih populacija svijeta²².

Navedeni rezultati ukazuju na to da se 17 (58,6 %) navedenih populacija svijeta razlikuje u učestalosti alela *HPA-1*, *-2*, *-3*, *-5*, *-6*, *-9* i *-15* u usporedbi s populacijom ispitanica obuhvaćenih u ovom istraživanju.

Učestalost genotipa *HPA-1bb*, koji predstavlja rizik od fetomaternalne aloimunizacije na antigen *HPA-1a*, u ovom je istraživanju iznosila 1,7 %, dok je učestalost genotipa *HPA-5aa*, koji predstavlja rizik od fetomaternalne aloimunizacije na antigen *HPA-5b*, iznosila 70,2 %.

5.2. Presjek podataka nepodudarnosti u antigenima HPA u parovima majka/novorodenče te usporedba rezultata s dosadašnjim istraživanjima

Drugi cilj istraživanja bio je odrediti učestalosti nepodudarnosti u antigenima HPA u parovima majka/novorodenče. Dobivene rezultate istraživanja usporedili smo s učestalostima nepodudarnosti koje su do sada objavljene u literaturi. Najveći broj istraživanja obuhvatio je nepodudarnosti u antigenima HPA-1, -2, -3, -4 i -5, dok su učestalosti nepodudarnosti za ostale antigene HPA mnogo manje istražene. Primjerice, Castro i sur. iz Brazila su u skupini parova majka/novorodenče (N=105) naveli učestalost nepodudarnosti u antigenima HPA od 48 %¹, dok je u istraživanju iz Švicarske, Reiher i sur., uočena nepodudarnost u 45 % parova (N=241)². U ovom istraživanju, provedenom na 270 parova majka/novorodenče, utvrđeno je da je 57,8 % parova bilo nepodudarno u antigenima HPA.

Za razliku od ukupnog postotka svih nepodudarnosti, učestalost nepodudarnosti u pojedinim antigenima HPA prilično se razlikuje od istraživanja do istraživanja. Primjerice, u istraživanju Castro i sur. su najučestalije nepodudarnosti u parovima majka/novorodenče zabilježene u antigenima HPA-3b, -2b i -1b te su bile 20, 14 i 13 %¹. Učestalost nepodudarnosti u antigenima HPA-5b bila je 9 %, a u antigenima HPA-1a 1 %. Pet najučestalijih nepodudarnosti u antigenima HPA u parovima majka/novorodenče u istraživanju Reiher i sur. bile su u antigenima HPA-1b, -2b, -3a, -3b i -5b te su bile od 7-14 %². Za ostalih pet ispitivanih antigena (HPA-1a, -2a, -4a, -4b i -5a) učestalost nepodudarnosti bila je ≤ 1 %². U istraživanju Ohto i sur. (Japan) najučestalija nepodudarnost zabilježena je u antigenima HPA-3b (13 %), potom antigenima HPA-3a (11 %) i -2b (10 %) te, na kraju, u antigenima HPA-5b (5 %), dok su nepodudarnosti u antigenima HPA-4b i -6b iznosile 0,8 i 2 %⁸².

Analizom 156 nepodudarnih antigena HPA u ovom istraživanju dobivene su četiri najučestalije nepodudarnosti: HPA-1b, -2b, -5b i -15a, dok su manje učestale nepodudarnosti uočene u antigenima HPA-1a, -2a, -4b i -8b. Učestalosti nepodudarnosti u antigenima HPA-1a, -2a, -2b, -3a i -3b u ovom istraživanju odgovarale su rezultatima svih dosadašnjih objavljenih istraživanja^{1,2,82}.

Za razliku od navedenih nepodudarnosti, učestalosti nepodudarnosti u antigenima HPA-1b, -4b, -5b, -5a i -6b u ovom istraživanju razlikuju se od literaturnih podataka. Primjerice, učestalost nepodudarnosti u antigenima HPA-5b u ovom istraživanju bila je veća (16 %) u usporedbi s objavljenim rezultatima Castro i sur. (9 %)¹, Reiher i sur. (7 %)² i Ohto i sur. (5 %)⁸². Slični rezultati dobiveni su i za nepodudarnosti u antigenima HPA-1b i -5a, a učestalosti nepodudarnosti u ovom istraživanju iznosile su 18 i 14 %, što je također nešto veći postotak u

usporedbi s rezultatima objavljenim u istraživanju Castro i sur. (12 i 9 %) ¹, Reiher i sur. (11 i 7 %) ² i Ohto i sur. (< 0,1 i 0,3 %) ⁸². Moguće je da je veća pojava nepodudarnosti u antigenima HPA-1b i -5b u provedenom istraživanju posljedica veće učestalosti navedenih gena u usporedbi s učestalostima tih gena u populacijama Njemačke, Brazila i Japana ^{1,2,82}.

Očekivano, nepodudarnosti u antigenima niske učestalosti, poput antigena HPA-4b i -6b, u ovom istraživanju bile su manje (0,5 i 0 %), što je u skladu s rezultatima nepodudarnosti istraživanja provedenih u Europi (0 %) ², dok su navedene nepodudarnosti u Japanu (0,8 i 2 %) očekivano bile veće ⁸².

5.3. Usporedba rezultata istraživanja učestalosti i specifičnosti protutijela anti-HPA i anti-HLA u serumu ispitanica s drugim populacijama

Jedan od ciljeva istraživanja bio je utvrditi učestalost i specifičnost protutijela anti-HPA i anti-HLA u ispitanica. Za razliku od antieritrocitnih protutijela koja mogu uzrokovati HBN te se stoga rutinski određuju u sklopu određivanja krvne grupe ABO, utvrđivanje antitrombocitnih protutijela anti-HPA i anti-HLA ne provodi se u sklopu zdravstvene zaštite trudnica. Time se može objasniti mali broj objavljenih istraživanja o učestalosti i specifičnosti protutijela anti-HPA u trudnica i/ili žena koje su rodile.

U prospektivnom istraživanju Schnaidt i sur. koje je obuhvatilo skupinu od 500 darivateljica krvi, u njih 21 (4,2 %) dokazana su protutijela anti-HPA ⁸⁴. Reiher i sur. (N=241) utvrdili su učestalost protutijela anti-HPA u ispitanica nakon poroda od 4 %, dok je učestalost protutijela anti-HPA u ispitanica s dokazanom nepodudarnošću u odgovarajućem antigenu HPA bila dvostruko manja (2 %) ². Nešto manje učestalosti protutijela anti-HPA od gore navedenih objavljene su u prospektivnim istraživanjima Castro i sur. (N=105, Brazil) i Ohto i sur. (N=24 630, Japan) te su bile 0,05 i 0,91 % ^{1,82}.

Podatci o specifičnosti pojedinih protutijela anti-HPA ne razlikuju se značajno između pojedinih istraživanja. Primjerice, u istraživanju Schnaidt i sur. najučestalija protutijela bila su anti-HPA-5b (3,2 %), potom anti-HPA-1a (0,8 %) te, na kraju, protutijela anti-HPA-5a (0,2 %) ⁸⁴. Vrlo slične specifičnosti objavljene su u istraživanju Reiher i sur. gdje je učestalost protutijela anti-HPA-5b iznosila 2,1 %, a učestalost protutijela ostalih specifičnosti (anti-HPA-1a/b, -2a/b i -3a/b) 0,4 % ². U istraživanju Castro i sur. te u istraživanju Ohto i sur. su također najučestalija bila protutijela anti-HPA-5b s učestalošću 0,05 i 0,68 % ^{1,82}. Iz navedenoga proizlazi da se u postupku pretraživanja antitrombocitnih protutijela najčešće

dokazuju protutijela anti-HPA-5b, dok se protutijela ostalih specifičnosti većinom otkrivaju sporadično.

Unatoč visokom postotku nepodudarnosti u antigenima HPA u parovima majka/novorodjenče u ovom istraživanju, protutijela anti-HPA dokazana su u samo šest (2,2 %) ispitanica, a najučestalije protutijelo bilo je protutijelo anti-HPA-5b (1,9 %). Protutijela anti-HPA-1a, koja se smatraju klinički najznačajnijima u patofiziologiji FNAIT-a, u ovom istraživanju nisu dokazana niti u jednom slučaju. Podatci o učestalosti i specifičnosti protutijela anti-HPA dobiveni ovim istraživanjem usporedivi su s rezultatima objavljenih istraživanja^{1,2,82,84}.

Protutijela anti-HPA-4b u populacijama Europe i SAD-a vrlo se rijetko dokazuju te su opisana samo kao pojedinačni prikazi slučajeva^{96,97}. Ova protutijela češće se javljaju u populacijama Azije. Primjerice, u istraživanju Ohto i sur. protutijela anti-HPA-4b bila su druga po učestalosti (0,2 %), odmah iza protutijela anti-HPA-5b. U ovom su istraživanju, uz protutijela anti-HPA-5b kod jedne ispitanice (0,4 %) dokazana i protutijela anti-HPA-4b.

Podatci o učestalosti protutijela anti-HLA razlikuju se od istraživanja do istraživanja i prvenstveno ovise o osjetljivosti i specifičnosti metode za otkrivanje protutijela anti-HLA te se u brojnim slučajevima ne mogu usporediti. Primjerice, u istraživanju Reiher i sur. u skupini trudnica zabilježena je učestalost protutijela anti-HLA od 41 %², dok su Masson i sur. u skupini od 294 ispitanice utvrdili učestalost protutijela anti-HLA od 54,4% u skupini prvorođki, a 74 % u skupini višerođki⁸⁶. U ovom su istraživanju protutijela anti-HLA dokazana u serumu 18,2 % ispitanica. U usporedbi s podacima učestalosti protutijela anti-HLA objavljenima u radovima Reiher i sur. i Masson i sur., učestalost protutijela anti-HLA u skupini ispitanica u ovom istraživanju bila je statistički značajno niža (χ^2 test, **P<0,001**). Niža učestalost protutijela anti-HLA u ovom istraživanju posljedica je veće granične vrijednosti testa (engl. *cut-off*) za otkrivanje protutijela anti-HLA. Prema tome, u istraživanju se nisu bilježila slabo pozitivna protutijela anti-HLA (intenzitet fluorescencije MFI < 1500), već su se zbrajala samo protutijela anti-HLA za koja se smatralo da su klinički značajna (MFI \geq 1500).

5.4. Osvrt na pojedine gene *HLA-DRB1/3/4/5* povezane s fetomatemalnom aloimunizacijom na antigene HPA

Brojna istraživanja uočila su povezanost pojedinih gena *HLA-DRB1/3/4/5* i fetomatemalne aloimunizacije na antigene HPA. Primjerica, u istraživanju Railton i sur. iz 2001. godine utvrđena je statistički značajno manja učestalost gena *HLA-DRB1*12* i *HLA-DRB1*15* u skupini od 40 ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA-1a⁹⁸. Četiri godine nakon objave ovog istraživanja, Sukati i sur. su utvrdili da alel *HLA-DRB1*15:01* umanjuje rizik od fetomatemalne aloimunizacije na antigene HPA-1a⁹⁹. U ovom istraživanju dokazana je statistički značajno manja učestalost alela *HLA-DRB1*15:01* u ispitanica s protutijelima anti-HPA, čime je potvrđeno da navedeni alel umanjuje rizik od fetomatemalne aloimunizacije na antigene HPA te rezultati odgovaraju objavljenim rezultatima dosadašnjih istraživanja. Za razliku od alela *HLA-DRB1*15:01*, za alel *HLA-DRB1*15:02* nije dokazana povezanost s fetomatemalnom aloimunizacijom. Za gen *HLA-DRB1*12*, koji se uz gen *HLA-DRB1*15* navodi u literaturi, u ovom istraživanju nije nađena statistički značajna povezanost s fetomatemalnom aloimunizacijom. Ovdje je potrebno naglasiti da je učestalost gena *HLA-DRB1*12* u Hrvatskoj približno 1,5 %, dok je učestalost gena *HLA-DRB1*15* oko 10 %¹⁰⁰.

Slično kao i za gene *HLA-DRB1*15* i *HLA-DRB1*12*, gen *HLA-DRB5*01* također se u literaturi često navodi kao čimbenik koji umanjuje rizik od fetomatemalne aloimunizacije na antigene HPA. U istraživanju Railton i sur. gen *HLA-DRB5*01* nije bio uočen niti u jedne aloimunizirane trudnice⁹⁸. Rezultati ovog istraživanja potvrdili su objavljene literaturne podatke o povezanosti gena *HLA-DRB5*01* i fetomatemalne aloimunizacije te su dodatno otkrili i alel *HLA-DRB5*01:01* kao čimbenik koji umanjuje rizik od aloimunizacije. Za razliku od alela *HLA-DRB5*01:01*, za alel *HLA-DRB5*01:02* nije dokazana statistički značajna povezanost s fetomatemalnom aloimunizacijom.

Nadalje, geni koje se smatra čimbenicima rizika za fetomatemalnu aloimunizaciju dobro su poznati. Najviše istraživani alel *HLA-DRB3*01:01* u brojnim istraživanjima potvrđen je kao čimbenik rizika za fetomatemalnu aloimunizaciju na antigene HPA-1a. Delbos i sur. su u svom istraživanju opazili da vjerojatnost fetomatemalne aloimunizacije na antigene HPA-1a u ispitanica u kojih alel *HLA-DRB3*01:01* nije dokazan iznosi samo 2,5 %¹⁰¹. Meta analiza Kjeldsen i sur. koja je obuhvatila četiri prospektivna i pet retrospektivnih istraživanja potvrdila je da trudnice bez alela *HLA-DRB3*01:01* imaju nizak rizik aloimunizacije na antigene HPA-1a fetusa⁷⁰. U navedenim rijetkim slučajevima fetomatemalne aloimunizacije,

titar protutijela anti-HPA-1a bio je statistički značajno niži od titra protutijela u ispitanica u kojih je alel *HLA-DRB3*01:01* bio dokazan. Nadalje, novorođenčad ispitanica u kojih alel *HLA-DRB3*01:01* nije bio dokazan imala je blažu trombocitopeniju od novorođančadi ispitanica u kojih je navedeni alel bio prisutan. Rezultati ovog istraživanja potvrdili su prethodno objavljene rezultate, odnosno ukazali su na statistički značajnu povezanost gena *HLA-DRB3*01* i rizika od fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA te su također identificirali alel *HLA-DRB3*01:01* kao čimbenik rizika za fetomaternalnu aloimunizaciju.

U literaturi se uz alel *HLA-DRB3*01:01* navode geni *HLA-DRB1*13* i *HLA-DRB1*14* kao mogući čimbenici rizika za fetomaternalnu aloimunizaciju na antigene HPA. U istraživanjima Panzer i sur. te Mueller i sur. navodi se statistički značajna povezanost oba gena s fetomaternalnom aloimunizacijom na antigene HPA, točnije na antigen HPA-5b^{102,103}. U novijim istraživanjima, naprimjer u istraživanjima Castro i sur. i Reiher i sur., učestalost navedenih gena bila je veća u ispitanica s protutijelima anti-HPA, iako razlike između ispitivanih skupina nisu bile statistički značajne^{1,2}. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je alel *HLA-DRB1*13:01* bio statistički značajno češće prisutan u ispitanica s protutijelima anti-HPA, čime je potvrđeno da navedeni alel uvećava rizik od fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA. Za alele *HLA-DRB1*13:02* i *HLA-DRB1*13:03*, kao niti za gen *HLA-DRB1*14*, nije dokazana statistički značajna povezanost s fetomaternalnom aloimunizacijom.

5.5. Usporedba rezultata istraživanja učestalosti i specifičnosti protutijela anti-HPA i anti-HLA u serumu ispitanica čija je novorođenčadi imala FNAIT s drugim populacijama

Dostupni literaturni podatci upućuju na to da je većina FNAIT-a uzrokovana fetomaternalnom aloimunizacijom na jedan od pet antigenskih sustava: HPA-1, -2, -3, -5 i -15^{47,49,55}.

Prema objavljenim podacima, najučestaliji uzrok FNAIT-a je protutijelo anti-HPA-1a (50-79 %) ^{72,79,104-107}. U dosad najvećem objavljenom retrospektivnom istraživanju serološki potvrđenih trombocitopenija u SAD-u (N=1162), autori su utvrdili da je najučestalije protutijelo bilo protutijelo anti-HPA-1a⁷² (79 % ispitanica). Slične učestalosti protutijela anti-HPA-1a objavljene su i u drugim istraživanjima – u retrospektivnom istraživanju Mueller-Eckhardt i sur. provedenom u Njemačkoj (N=384) učestalost je bila 78 %⁷⁹, u retrospektivnom istraživanju de Vos i sur. provedenom u Nizozemskoj (N=221) navedeno protutijelo bilo je prisutno u 73 % slučajeva¹⁰⁴ te u istraživanju provedenom u skupini od 200 ispitanica iz Velike Britanije taj postotak je bio 75 %¹⁰⁵. U istraživanju Schechter i sur.

provedenom u Izraelu (N=18), protutijela anti-HPA-1a dokazana su u 11 ispitanica (61 %) ¹⁰⁶. U restrospektivnom istraživanju Krivec i sur. u Sloveniji (N=22) protutijela anti-HPA-1a identificirana su u 15 (68 %) slučajeva FNAIT-a ¹⁰⁸. U Hrvatskoj je 2008. godine objavljeno restrospektivno istraživanje Tomičić i sur. koje je obuhvaćalo sve FNAIT-e (N=14) koji su bili dijagnosticirani u desetogodišnjem razdoblju (1997.-2007.) ¹⁰⁷. U istraživanju je objavljeno da je FNAIT u sedam (50 %) slučajeva bio uzrokovan protutijelima anti-HPA-1a. U ovom istraživanju protutijela anti-HPA-1a identificirana su u osam (36,4 %) slučajeva FNAIT-a, što je manja učestalost u usporedbi s rezultatima ostalih istraživanja provedenih na području Europe i SAD-a.

Brojna istraživanja o prevalenciji fetomaternalne aloimunizacije na antigen HPA-1a pokazala su povezanost aloimunizacije ispitanica i alela *HLA-DRB3*01:01*. Učestalost alela *HLA-DRB3*01:01* u ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA-1a bila je od 85-100 % ^{101,109-112}. Istraživanja koja su ispitivala prevalenciju fetomaternalne aloimunizacije, odnosno povezanost aloimunizacije s alelom *HLA-DRB3*01:01*, također su obuhvatila kontrolnu skupinu ispitanica kod kojih u serumu nisu bila dokazana protutijela anti-HPA. Učestalost alela *HLA-DRB3*01:01* u tim skupinama ispitanica bila je 32 % u istraživanju provedenom u Norveškoj ¹⁰⁹, 29 % u Poljskoj ¹¹⁰, 30 % u Kanadi ¹¹¹, 33 % u Francuskoj ¹⁰¹ te 23 % u Njemačkoj ¹¹². Zanimljivo je da je učestalost alela *HLA-DRB3*01:01* u skupini ispitanica bez protutijela u ovom istraživanju bila manja (19,4 %) od objavljenih literaturnih podataka. S obzirom na to da je alel *HLA-DRB3*01:01* dokazani čimbenik rizika za fetomaternalnu aloimunizaciju na antigene HPA-1a, upravo bi niži postotak alela u ovom istraživanju mogao objasniti manju učestalost protutijela anti-HPA-1a.

Protutijela anti-HPA-5b u literaturi objavljenoj u Europi i SAD-u navode se kao druga po učestalosti u patofiziologiji FNAIT-a. U istraživanju Davoren i sur. učestalost protutijela anti-HPA-5b bila je 9 % ⁷², dok je u istraživanju Mueller-Eckhardt i sur. učestalost bila 19 % ⁷⁹. Slična učestalost objavljena je u istraživanju Ghevaert i sur. (15,5 %) ¹⁰⁵. Nešto viša učestalost objavljena je u istraživanju Schechter i sur. gdje su protutijela anti-HPA-5b dokazana u pet (28 %) slučajeva ¹⁰⁶ te u istraživanju de Vos i sur. u 23 % slučajeva ¹⁰⁴. U restrospektivnom istraživanju iz 2007. godine provedenom u Hrvatskoj, kao uzrok FNAIT-a navode se protutijela anti-HPA-5b u pet (37,5 %) slučajeva ¹⁰⁷.

Podatci o učestalosti i specifičnosti protutijela anti-HPA-5b uvelike se razlikuju između populacija Europe i Azije. U istraživanju Ohta i sur. provedenom u Japanu (N=223), protutijela anti-HPA-5b (75,3 %) bila su najčešći uzročnik FNAIT-a ⁸². Brazilsko istraživanje Castro i sur., koje je obuhvaćalo skupinu ispitanica (N=105) čija novorođenčad je imala

trombocitopeniju, pokazalo je u 12 % ispitanica koje su bile nepodudarne u antigenima HPA s novorođenčeta prisutnost protutijela anti-HPA-5b, dok protutijela drugih specifičnosti nisu dokazana¹.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su prisutnost protutijela anti-HPA-5b u 45,5 % ispitanica, a ujedno su bila najčešći uzrok FNAIT-a. Ovo je prvo istraživanje u kojem je dokazana veća učestalost protutijela anti-HPA-5b od -1a u ispitanica čija su djeca imala FNAIT.

Nekoliko je mogućih objašnjenja za najveću učestalost protutijela anti-HPA-5b u patofiziologiji FNAIT-a u ovom istraživanju. Prvo, moguće je da je veća učestalost protutijela anti-HPA-5b posljedica većeg postotka nepodudarnosti u antigenima HPA-5b u skupini ispitanica u usporedbi s prethodno objavljenim učestalostima nepodudarnosti u ostalim populacijama^{1,2,82}. Drugi mogući uzrok može se povezati s manjom učestalošću protutijela anti-HLA-1a, odnosno manjom sklonosti fetomaternalne aloimunizacije na antigen HPA-1a zbog manje učestalosti alela *HLA-DRB3*01:01* u ispitivanom uzorku.

Nadalje, prilikom interpretacije rezultata ovog istraživanja treba uzeti u obzir da protutijela anti-HPA-5b najčešće uzrokuju blage trombocitopenije te da se u našoj ustanovi provodi imunohematološka obrada svih trombocitopenija, uključujući i slučajeve blagih i asimptomatskih trombocitopenija novorođenčadi bez klinički vidljivog krvarenja te trombocitopenije koje imaju potvrđen drugi, neimunološki uzrok koji potencijalno isključuje FNAIT. Za pretpostaviti je da se u drugim ustanovama takvi slučajevi najvjerojatnije laboratorijski ne obrađuju te se stoga otkriva manje FNAIT-a uzrokovanih protutijelima anti-HPA-5b.

Protutijela ostalih specifičnosti značajno su manje učestala od protutijela anti-HPA-1a i -5b, odnosno javljaju se sporadično. Primjerice, za protutijela anti-HPA-1b učestalost u istraživanju Davoren i sur. bila je 9,1 %, u istraživanju Schechter i sur. su navedena protutijela dokazana samo u jedne (5,5 %) ispitanice¹⁰⁶, dok je u ostalim istraživanjima učestalost bila < 1 %^{79,105}. Učestalost protutijela anti-HPA-1b među ispitanicama u ovom istraživanju bila je 9,1 %⁷², što odgovara istraživanju Davoren i sur. (SAD).

Protutijela anti-HPA-2b i -5a kao uzrok FNAIT-a identificiraju se u oko 1 % ispitanica^{72,105}, što je niže od učestalosti dobivene ovim istraživanjem.

Podatci za protutijela anti-HPA-3a razlikuju se između pojedinih istraživanja pa se tako u istraživanju Davoren i sur. navodi učestalost od 2 %⁷², dok je u istraživanju Krivec i sur. navedeno protutijelo u 3 (14 %) slučaja¹⁰⁸. U pojedinim istraživanjima navedena protutijela nisu dokazana^{79,105}, što odgovara i dobivenim rezultatima. Naime, u ovom istraživanju protutijela anti-HPA-3a također nisu dokazana niti u jedne ispitanice.

U osoba s mutacijom gena CD36 i nedostatkom kompleksa GPIV može doći do fetomaterne aloimunizacije na navedeni kompleks te su opisani FNAIT-i uzrokovani protutijelima na kompleks GPIV (CD36)⁸⁰. Mutacije gena CD36 u populaciji Europe vrlo su rijetke te se slučajevi FNAIT-a uzrokovanih protutijelima na kompleks GPIV vrlo rijetko opisuju u literaturi⁷². Za razliku od podataka za populacije Europe, protutijela na kompleks GPIV češća su u populacijama Azije te se prema učestalosti javljaju iza protutijela anti-HPA-5b i -4b (0,9 %)⁸². Temeljem tih saznanja bilo je i za očekivati da niti jedno aloprotutijelo na kompleks GPIV neće biti uzrok FNAIT-a u provedenom istraživanju, što je i pokazano u rezultatima.

5.6. Osvrt na pojedine gene *HLA-DRB1/3/4/5* povezane sa specifičnim protutijelima anti-HPA u serumu ispitanica čija je novorođenčadi imala FNAIT

Osim utvrđivanja čimbenika rizika za aloimunizaciju na antigene HPA, ovim istraživanjem željeli smo utvrditi postoji li povezanost pojedinih alela i protutijela anti-HPA određene specifičnosti. U skupini ispitanica čija je novorođenčad imala FNAIT, uočeno je da su aleli *HLA-DRB3*01:01* i *HLA-DRB3*02:02* statistički značajno češće bili prisutni u ispitanica s protutijelima anti-HPA-1a, odnosno anti-HPA-5b. Dobiveni rezultati za alel *HLA-DRB3*01:01* u skladu su s dosad objavljenim istraživanjima o povezanosti navedenog alela i protutijela anti-HPA-1a^{101,113}, dok povezanost alela *HLA-DRB3*02:02* s protutijelima anti-HPA-5b do sada nije opisana u literaturi. Neophodna su istraživanja u drugim populacijama kako bismo utvrdili je li to specifičnost naše populacije ili je taj alel i u drugim populacijama povezan s nastankom FNAIT-a.

5.7. Utjecaj nepodudarnosti u antigenima ABO i HPA na fetomaterne aloimunizaciju

Brojni su radovi potvrdili da nepodudarnost u antigenima ABO između majke i djeteta štiti majku od fetomaterne aloimunizacije na RhD eritrocitne antigene, odnosno smanjuje učestalost HDN-a. Naime, u slučaju nepodudarnosti u antigenima ABO između majke i djeteta, majčina protutijela anti-A i anti-B hemoliziraju fetalne eritrocite koji tijekom trudnoće prijeđu kroz posteljicu u cirkulaciju majke. Zbog toga se fetalni eritrociti uklanjaju iz cirkulacije prije nego što dođe do prepoznavanja tih „tuđih“ antigena i predočavanja limfocitima B pomoću dendritičnih stanica. Levine i sur. prvi su objavili da je učestalost

HDN-a u RhD negativnih majki manja u slučajevima kada postoji nepodudarnosti u antigenima ABO između majke i djeteta¹¹⁴. Zwiers i sur. su kasnije potvrdili da je ABO nepodudarnost, osim s RhD eritocitnim antigenima, povezana i s fetomaternalnom aloimunizacijom na druge eritrocitne antigene¹¹⁵.

S obzirom na to da trombociti fetusa, osim specifičnih antigena HPA na membrani, u manjoj koncentraciji sadrže i antigene ABO, za pretpostaviti je da će nepodudarnost u antigenima ABO majke/djeteta također biti povezana s fetomaternalnom aloimunizacijom majke na antigene HPA. Istraživanja Levine i sur. te Zwiers i sur. ispitivala su povezanost majčine krvne grupe ABO s učestalošću FNAIT-a te su pokazala sličnu raspodjelu krvnih grupa ABO majki u djece s FNAIT-om^{114,115}. Nadalje, u istraživanju Ahlen i sur. u skupini ispitanica s protutijelima anti-HPA-1a (N=154) ispitivana je povezanost ABO nepodudarnosti te povezanost ABO krvne grupe majke i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA-1a¹¹⁶. U istraživanju nije dokazana statistički značajna povezanost ABO nepodudarnosti niti krvne grupe ABO majke i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA-1a. U novorođenčadi aloimuniziranih majki krvne grupe O dokazan je statistički značajan rizik od teškog FNAIT-a u uporedbi s novorođenčadi imuniziranih majki ostalih ABO krvnih grupa. Nadalje, u istraživanju Miserre i sur., u skupini ispitanica s protutijelima anti-HPA-1a (N=118) određen je genotip krvnih grupa ABO¹¹⁷. U tom istraživanju nije dokazana statistički značajna povezanost genotipova krvnih grupa ABO niti s učestalošću protutijela anti-HPA-1a niti s težinom trombocitopenije novorođenčeta. Nadalje, u navedenom istraživanju postavljena je hipoteza da nepodudarnost u antigenima ABO štiti majku od aloimunizacije na antigene HPA fetusa, što rezultati nisu potvrdili.

Izostanak zaštitnog djelovanja protutijela anti-A i anti-B može se objasniti postojanjem individualnih razlika u količini antigena A i B na trombocitima. Osobe krvne grupe A2 imaju vrlo malu količinu antigena A na trombocitima, dok kod osoba krvne grupe A1 postoje individualne razlike u količini antigena A, ovisno o tome postoji li visok ili nizak izražaj antigena ABO. Izražaj antigena A i B prvi je puta opisan u istraživanju Osagawara i sur. u kojemu je 4,1 % ispitanika (darivatelja krvi) imalo veliku količinu antigena A i B na trombocitima, dok je preostali broj ispitanika na trombocitima imao samo manje količine antigena A i B¹¹⁸. Za razliku od trombocita odraslih osoba, količina antigena A i B na trombocitima fetusa značajno je manja¹¹⁹.

Drugi mogući uzrok za nepovezanost nepodudarnosti u antigenima ABO s aloimunizacijom na antigene HPA fetusa je postojanje alternativnog izvora fetomaternalne aloimunizacije. Smatra se da fetalne stanice koja nemaju antigene A i B, poput leukocita, krvotvornih

matičnih stanica ili stanica trofoblasta posteljice, također mogu dovesti do aloimunizacije trudnica na antigene HPA¹²⁰. Ulazak fetalnih stanica u cirkulaciju majke fiziološki je događaj koji se javlja već od četvrtog do šestog gestacijskog tjedna¹²¹. Rani kontakt s aloantigenima na stanicama trofoblasta već u prvoj trudnoći može uzrokovati aloimunizaciju na antigene HPA-1a, a upravo izostanak antigena A i B na stanicama trofoblasta može objasniti nedostatak povezanosti nepodudarnosti u antigenima ABO i fetomaternalne aloimunizacije. U ovom istraživanju nije nađena statistički značajna povezanost krvne grupe ABO ispitanica niti povezanost nepodudarnosti u antigenima ABO u parovima majka/novorodjenče i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA i HLA.

Povezanost nepodudarnosti u antigenima HPA i fetomaternalne aloimunizacije na navedene antigene ispitivana je u istraživanjima Castro i sur. i Reiher i sur.^{1,2}. Castro i sur. su objavili da je nepodudarnost u antigenima HPA bila prisutna u gotovo polovici ispitivanih parova majka/novorodjenče, a naučestalije nepodudarnosti bile su u antigenima HPA-2, -3 i -5. Od dokazanih protutijela, identificirana su samo protutijela anti-HPA-5b, dok protutijela anti-HPA-2a/b i -3a/b nisu dokazana niti u jedne ispitanice, unatoč dokazanim nepodudarnostima za pripadajuće antigene HPA.

Nadalje, rezultati nepodudarnosti u antigenima HPA u istraživanju Reiher u sur.² (45 %) bili su slični rezultatima istraživanja Castro i sur., a protutijela anti-HPA također su dokazana samo u manjem broju ispitanica s dokazanom nepodudarnošću (2 %), što upućuje na nisku imunogeničnost antigena HPA. Imunogeničnost antigena HPA u istraživanju izračunata je iz učestalosti protutijela anti-HPA u ispitanica s dokazanom nepodudarnošću te je iznosila 10-12 % za antigen HPA-1a, a 20 % za antigen HPA-5b. Nadalje, istraživanjem je utvrđeno da je fetomaternalna aloimunizacija na antigene HPA manje učestala od aloimunizacije na antigene HLA, odnosno da je imunogeničnost antigena HPA deset puta manja od imunogeničnosti antigena HLA. Ovakvi rezultati navode na zaključak da vjerojatno postoje drugi čimbenici rizika za fetomaternalnu aloimunizaciju na antigene HPA.

U ovom istraživanju najčešće su dokazana protutijela anti-HPA-5b (1,9 %), dok protutijela anti-HPA-2a/b, -3a/b i -5a, unatoč velikom postotku nepodudarnih parova, nisu dokazana. Statistički značajna povezanost nepodudarnosti u antigenima HPA i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA ovim istraživanjem nije dokazana, što je u skladu s prethodno objavljenim istraživanjima.

5.8. Ostali potencijalni čimbenici rizika za fetomaternalnu aloimunizaciju

Uz već navedene čimbenike rizika za fetomaternalnu aloimunizaciju, bilo je zanimljivo istražiti dodatne potencijalne čimbenike koji bi mogli utjecati na učestalost fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA i HLA. Iako protutijela anti-HPA i anti-HLA mogu nastati već u prvoj trudnoći, učestalost fetomaternalne aloimunizacije na trombocitne antigene raste s porastom broja trudnoća odnosno poroda i/ili pobačaja.

U velikom prospektivnom istraživanju (N=24630) Ohto i sur. objavili su učestalost protutijela anti-HPA u četiri skupine ispitanica koje su se razlikovale po broju trudnoća. Učestalosti protutijela anti-HPA u ispitanica kojima je ovo bila prva, druga, treća ili četvrta trudnoća iznosile su 0,2; 1,1; 1,6 i 2,0 %⁸². Reiher i sur. su potvrdili i da s brojem poroda u ispitanica raste učestalost protutijela anti-HPA, međutim, povezanost broja poroda s fetomaternalnom aloimunizacijom na antigene HPA nije bila statistički značajna. I u ovom istraživanju za protutijela anti-HPA nije bilo statistički značajnih razlika u raspodjeli prema broju poroda ispitanica.

U radu iz 2010. god. Triulzi i sur., u skupini od preko 8000 dobrovoljnih darivateljica krvi, našli su učestalost protutijela anti-HLA razreda I od 1,7 % u žena koje nisu rodile, a 24,4 % u žena koje su rodile¹²². Istraživanje pokazuje tendenciju rasta učestalosti protutijela anti-HLA s brojem poroda, pa je tako u ispitanica koje su rodile jedno dijete učestalost iznosila 11,2 %, u ispitanica s dvoje djece 22,5 %, s troje 27,5 % te s četvero ili više djece 32,2 %. Učestalost protutijela anti-HLA u žena koje nisu rodile, a imale su jedan rani pobačaj bila je 1,2 % te se nije značajno razlikovala od učestalosti protutijela anti-HLA u ispitanica koje nisu rodile.

U istraživanju Powers i sur. su navedeni rezultati učestalosti protutijela anti-HLA razreda I i II u skupini dobrovoljnih darivateljica krvi koje su rodile (N=1009) od 33 %, dok je učestalost protutijela anti-HLA u darivateljica koje nisu rodile bila 1 %¹²³. Autori su također naveli da je anamnestički podatak o trudnoći imao statističku značajnost u povezanosti s fetomaternalnom aloimunizacijom na antigene HLA.

Slično kao u istraživanju Triulzi i sur. i Powers i sur., ispitanice u istraživanju Reiher i sur. u kojih je bio zabilježen veći broj poroda, češće su imale prisutna protutijela anti-HLA u serumu, međutim, u istraživanju nije dokazana statistički značajna povezanost broja poroda ispitanica i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HLA².

U ovom istraživanju također je bio zabilježen rast učestalosti protutijela anti-HLA s brojem poroda, pa je tako učestalost u ispitanica koje nisu rodile iznosila 6,5 %, u ispitanica koje su rodile jedno dijete 24,2 %, u ispitanica s dvoje djece 41,3 %, s troje 48,5 % te s četvero ili više

djece 58,3 %. Rezultati ovog istraživanja usporedivi su s rezultatima Reiher i sur. te se iz njih može zaključiti sljedeće: iako je učestalost protutijela anti-HLA u ispitanica u provedenom istraživanju rasla razmjerno s brojem poroda, nije dokazana statistički značajna razlika između ispitivanih skupina.

Ovakvi rezultati mogli bi se objasniti specifičnim imunološkim promjenama koje se događaju u trudnoći. Brojni radovi potvrđuju da tijekom trudnoće dolazi do supresije imunskog sustava trudnica. Tako, naprimjer, u nekih autoimunih bolesti poput reumatoidnog artritisa i multiple skleroze tijekom trudnoće dolazi do poboljšanja kliničke slike^{124,125}. Nadalje, potvrđeno je da majčin imunski sustav intenzivnije reagira na očeve antigene u tijeku prve trudnoće i poroda, odnosno prije nego se stvori specifična imunotolerancija¹²⁶.

Dokazano je da fetalne stanice tijekom trudnoće prelaze kroz posteljicu u cirkulaciju majke te se u organizmu majke mogu dokazati dugo nakon poroda. Pojava fetalnih stanica koje sadrže antigene naslijeđene od oca, koji su nepoznati imunskom sustavu majke, naziva se fetalni mikrokimerizam (engl. *Fetal microchimerism*, FMC). Fetalne stanice dokazane su u tkivu maternice majke¹²⁸, a također se nalaze i u drugim majčinim organima i tkivima, naprimjer mozgu, koži, timusu, srcu, plućima, koštanoj srži, slezeni, bubrežima, jetri itd.¹²⁷.

Upravo te fetalne stanice, koje na svojoj membrani izražavaju zajedničke antigenske osobine, imaju važnu svrhu. Zadržavanje fetalnih stanica u organizmu majke potiče imunsku toleranciju majke na „nepoznate“ antigene koje je fetus naslijedio od oca. Fetalne stanice se u cirkulaciji majke mogu dokazati već u sedmom gestacijskom tjednu, a njihova koncentracija se povećava kako trudnoća odmiče te je najviša tijekom poroda¹²⁸. Postupno povećanje koncentracije fetalnih stanica u organizmu majke dovodi do povećanja količine regulatornih CD4+ limfocita T (engl. *T regulatory cells*, Tregs).

Lokalna (maternica) i sistemska (organi i tkiva trudnice) imunska tolerancija neophodna je za povoljan ishod trudnoće. Ukoliko se imunska tolerancija pravovremeno ne razvije, može doći do spontanih pobačaja ili preeklampsije trudnice¹²⁹. Nadalje, dokazano je da imunska tolerancija ostaje i nakon poroda te poboljšava ishod budućih trudnoća majke¹²⁶.

Navedene imunskie promjene tijekom trudnoće i nakon poroda mogle bi objasniti zašto, za razliku od prve trudnoće, broj narednih trudnoća, odnosno poroda nema toliko izražen utjecaj na fetomaternalnu aloimunizaciju.

Pretpostavka je da će ispitanice u kojih su već prisutna protutijela anti-HLA razviti i/ili pojačati imunološki odgovor na antigene HPA fetusa te dovesti do fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA i uzrokovati FNAIT. Tu pretpostavku potvrđuje i istraživanje Reiher i sur. u kojem je dokazana statistički značajna povezanost protutijela anti-HLA razreda

I i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA². Navedeni rezultati usporedivi su s ovim istraživanjem, u kojem je također dokazano da su prisutna protutijela anti-HLA razreda I čimbenici rizika za fetomaternalnu aloimunizaciju na antigene HPA.

Nadalje, brojna istraživanja pokazuju da se pojedina protutijela anti-HPA češće javljaju u kombinaciji s protutijelima anti-HLA razreda I. S obzirom na to da su protutijela anti-HPA-1a najučestaliji uzrok FNAIT-a u Europi i SAD-u, u literaturi se najviše podataka može naći o tim protutijelima. Tako je, naprimjer, istraživanje Dahl i sur. provedeno u Norveškoj, a koje je obuhvatilo 166 ispitanica s protutijelima anti-HPA-1a, dokazalo da su, uz ova protutijela anti-HPA-1a, u 67 % ispitanica istovremeno dokazana i protutijela anti-HLA razreda I¹³¹. U istraživanju Taaning i sur. (N=59) objavljena je učestalost kombinacije protutijela anti-HPA-1a s protutijelima anti-HLA 46,7 %¹³¹.

Za razliku od protutijela anti-HPA-1a, mnogo je manje istraživanja koja su obuhvaćala povezanost protutijela anti-HLA i protutijela anti-HPA-5b. U istraživanju Ohto i sur. provedenom na 138 ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA-5b, u samo 9 (6,5 %) ispitanica su uz anti-HPA-5b protutijela bila dokazana i protutijela anti-HLA razreda I⁸². Taj postotak je značajno manji od postotka protutijela anti-HPA-1a koja se javljaju istovremeno s protutijelima anti-HLA.

U ovom istraživanju je po prvi puta ispitivana prisutnost protutijela anti-HLA razreda I u ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HPA-1a i anti-HPA-5b. U skupini ispitanica s dokazanim protutijelima anti-HLA bilo je značajno više onih s protutijelima anti-HPA-5b (80,0 %) nego onih s protutijelima anti-HPA-1a (12,5 %). Iz navedenog proizlazi da postoji statistički značajna povezanost protutijela anti-HLA razreda I i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA-5b, dok povezanost s fetomaternalnom aloimunizacijom na antigene HPA-1a nije bila statistički značajna.

Ovakva bi istraživanja trebalo nastaviti na većoj skupini ispitanica i utvrditi postoji li povezanost određenih protutijela anti-HLA razreda I i nastanka FNAIT-a.

6. ZAKLJUČCI

1. U ovom istraživanju dokazana je podjednaka raspodjela alela HPA u usporedbi s 12 navedenih populacija Europe, dok se raspodjela alela HPA razlikovala u usporedbi s populacijama svijeta.
2. Četiri najučestalije nepodudarnosti u parovima majka/novorodjenče uočene su u antigenima HPA-1b, -5b, -2b i -15a.
3. Protutijela anti-HPA dokazana su u samo 2,2 % ispitanica, a najučestalije protutijelo bilo je anti-HPA-5b (1,9 %). Protutijela anti-HPA-1a u ovom istraživanju nisu dokazana niti u jednom slučaju. Učestalost protutijela anti-HLA iznosila je 18,2 %.
4. U istraživanju je dokazano da aleli *HLA-DRB1*15:01* i *HLA-DRB5*01:01* umanjuju, a aleli *HLA-DRB1*13:01* i *HLA-DRB3*01:01* povećavaju rizik od fetomaterne aloimunizacije na antigene HPA.
5. Kod najvećeg broja ispitanica (45,5 %) dokazana su protutijela anti-HPA-5b, dok su protutijela anti-HPA-1a dokazana u 36,4 % slučajeva.
6. U skupini ispitanica čija je novorođenčad imala FNAIT dokazana je povezanost alela *HLA-DRB3*01:01* i *HLA-DRB3*02:02* s prisutnošću protutijela anti-HPA-1a, odnosno -5b.
7. Nije dokazana povezanost krvne grupe ABO ispitanica niti povezanost nepodudarnosti u antigenima ABO i HPA u parovima majka/novorodjenče i fetomaterne aloimunizacije na antigene HPA i HLA.
8. Nije dokazana povezanost protutijela anti-HPA i anti-HLA s brojem poroda ispitanica.
9. Po prvi je puta dokazana povezanost protutijela anti-HLA razreda I i fetomaterne aloimunizacije na antigene HPA-5b.

7. LITERATURA

1. Castro V, Kroll H, Origa AF, Falconi MA, Marques SBD, Marba ST i sur. A prospective study on the prevalence and risk factors for neonatal thrombocytopenia and platelet alloimmunization among 9332 unselected Brazilian newborns. *Transfusion*. 2007 Jan;47(1):59–66.
2. Reiher VSA, Hönger G, Infanti L, Passweg JR, Hösli I, Frey BM i sur. Human platelet antigen antibody induction in uncomplicated pregnancy is associated with HLA sensitization. *Transfusion*. 2017;57(5):1272–9.
3. Lieberman L, Greinacher A, Murphy MF, Bakchoul T, Corke S, Tanael S i sur. Fetal-Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia (FNAIT): Guidance to Reduce the Risk of Intracranial Bleeding. *Blood*. 2018;132:4717–4717.
4. Ahlen MT, Husebekk A, Killie IL, Skogen B, Stuge TB. T cell responses to human platelet antigen-1a involve a unique form of indirect allorecognition. *JCI Insight*. 2016;1(14):1–14.
5. Van Loghem JJ, Dorfmeijer H, Van Hart M, Schreuder F. Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw). *Vox Sang*. 1959;4(2):161–9.
6. Shulman NR, Aster RH, Pearson HA, Hiller MC. Immunoreactions involving platelet. VI. Reactions of maternal isoantibodies responsible for neonatal purpura. Differentiation of a second platelet antigen system. *J Clin Invest*. 1962;41(5):1059–69.
7. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PI(A1) and PI(A2), are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest*. 1989;83(5):1778–81.
8. HPA Gene Database [Internet]. Dostupno na: <https://www.versiti.org/products-services/human-platelet-antigen-hpa-database> (2020)
9. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R i sur. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang*. 2003;85(3):240–5.
10. Curtis BR, Mcfarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox Sang*. 2014;106(2):93–102.
11. Chen ZY, Oswald BE, Sullivan JA, Dahmani FZ, Pasmán Y, Liu Z i sur. Platelet physiology and immunology: pathogenesis and treatment of classical and non-classical fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Ann Blood*. 2019;4:29–29.
12. Botero JP, Lee K, Branchford BR, Bray PF, Freson K, Lambert MP i sur. Glanzmann

- thrombasthenia: Genetic basis and clinical correlates. *Haematologica*. 2020;105(4):888–94.
13. Nurden AT, Freson K, Seligsohn U. Inherited platelet disorders. *Haemophilia*. 2012;18:154–60.
 14. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, Sixma JJ. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature*. 1985;318:470-472.
 15. Rözman P, Drabbels J, Schipper RF, Doxiadis I, Stein S, Claas FHJ. Genotyping for human platelet-specific antigens HPA-1, -2, -3, -4 and -5 in the Slovenian population reveals a slightly increased frequency of HPA-1b and HPA-2b as compared to other European populations. *Eur J Immunogenet*. 1999;26(4):265–9.
 16. Pavic M, Zadro R, Coen Herak D, Radic Antolic M, Dodig S. Gene frequencies of platelet-specific antigens in Croatian population. *Transfus Med*. 2010;20(2):73–7.
 17. Jovanovic Srzentic S, Lilic M, Vavic N, Radovic I, Djilas I. Genotyping of Eight Human Platelet Antigen Systems in Serbian Blood Donors: Foundation for Platelet Apheresis Registry. *Transfus Med Hemotherapy*. 2021;48(4):228–33.
 18. Ferrer G, Muñoz-Díaz E, Aluja MP, Arilla M, Martínez C, Nogués R i sur. Analysis of human platelet antigen systems in a Moroccan Berber population. *Transfus Med*. 2002;12(1):49–54.
 19. Salem AHA, Abdel Hamed AES, Abdalla EM, Almawi W. Gene frequencies of human platelet alloantigens 1-5 in two Arab populations. *Blood Transfus*. 2014;12:242–4.
 20. Tanaka S, Ohnoki S, Shibata H, Okubo Y, Yamaguchi H, Shibata Y. Gene frequencies of human platelet antigens on glycoprotein IIIa in Japanese. *Transfusion*. 1996;36(9):813–7.
 21. Nie YM, Zhou HJ, Fu YS, Wang CX, Ma JP. The allele frequencies of HPA 1-16 determined by PCR-SSP in Chinese Cantonese donors. *Transfus Med*. 2010;20(6):376–82.
 22. Halle L, Bigot A, Mullen-Imandy G, M'Bayo K, Jaeger G, Anani L i sur. HPA polymorphism in sub-Saharan African populations: Beninese, Cameroonians, Congolese, and Pygmies. *Tissue Antigens*. 2005;65(3):295–8.
 23. Feng ML, Liu DZ, Shen W, Wang JL, Guo ZH, Zhang X i sur. Establishment of an HPA-1- to -16-typed platelet donor registry in China. *Transfus Med*. 2006;16(5):369–74.
 24. Phuangtham R, Romphruk A, Puapairoj C, Leelayuwat C, Romphruk AV. Human platelet antigens in Burmese, Karen and north-eastern Thais. *Transfus Med*. 2017;27(1):60–5.
 25. Tanaka S, Taniue A, Nagao N, Ohnoki S, Shibata H, Okubo Y i sur. Simultaneous DNA Typing of Human Platelet Antigens 2, 3 and 4 by an Allele-Specific PCR Method. *Vox Sang*. 1995;68(4):225–30.

26. Al-Subaie AM, Al-Absi IK, Al-Ola K SS, Fawaz NA, Almawi WY. Gene Frequencies of Human Platelet Alloantigens in Bahraini Arabs. *Am J Hematol.* 2007;82:242–4.
27. Drzewek K, Brojer E, Župańska B. The frequency of human platelet antigen (HPA) genotypes in the Polish population. *Transfus Med.* 1998;8(4):339–42.
28. Pavkovic M, Petlichkovski A, Strezova A, Arsov T, Trajkov D, Spiroski M. Gene frequencies of human platelet antigens in the Macedonian population. *Tissue Antigens.* 2006;67(3):241–6.
29. Randen I, Killie MK, Kjeldsen-kragh J. Rapid and reliable genotyping of human platelet antigen (HPA)-1, -2, -3, -4, and -5 a/b and Gov a/b by melting curve analysis. *Immunohematology.* 2003;43:445–50.
30. Boehlen F, Bulla O, Michel M, Reber G, de Moerloose P. HPA-genotyping and antiplatelet antibodies in female blood donors. *Hematol J.* 2003;4(6):441–4.
31. Kekomäki S, Partanen J, Kekomäki R. Platelet alloantigens HPA-1, -2, -3, -5 and -6b in Finns. *Transfus Med.* 1995;5:193–8.
32. Hauck-Dlimi B, Hammon K, Eckstein R, Ott S, Zimmermann R, Dengler T i sur. Human platelet antigen genotypes in Turkish and Caucasian blood donors in Germany. *Tissue Antigens.* 2012;80(3):214–8.
33. Steffensen R, Kaczan E, Varming K, Jersild C. Frequency of platelet-specific alloantigens in a Danish population. *Tissue Antigens.* 1996;48(2):93–6.
34. Korniková P, Vytisková J, Suttnar J, Stehliková M, Dyr JE. Fetomaternal alloimmune thrombocytopenia (FMAIT)—diagnosis and impact on transfusion therapy. *Pediatr Res.* 1999;45:766.
35. Jones DC, Bunce M, Fuggle SV, Young NT, Marshall SE. Human platelet alloantigens (HPAs): PCR-SSP genotyping of a UK population for 15 HPA alleles. *Eur J Immunogenet.* 2003;30(6):415–9.
36. Holensteiner A, Walchshofer S, Adler A, Kittl EM, Mayr WR, Panzer S. Human platelet antigen gene frequencies in the austrian population. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 1995;25(3):133–6.
37. Hadhri S, Gandouz R, Chatti N, Bierling P, Skouri H. Gene frequencies of the HPA-1 to -6 and -15 human platelet antigens in Tunisian blood donors. *Tissue Antigens.* 2010;76(3):236–9.
38. Chiba AK, Bordin JO, Kuwano ST, Figueiredo MS, Carvalho KI, Vieira-Filho JP i sur. Platelet alloantigen frequencies in Amazon Indians and Brazilian blood donors. *Transfus Med.* 2000;10(3):207–12.

39. Bennett JA, Palmer LJ, Musk AW, Erber WN. Gene frequencies of human platelet antigens 1-5 in indigenous Australians in Western Australia. *Transfus Med.* 2002;12(3):199–203.
40. Al-Ouda SK, Al-Banyan AA, Abdel Gader AGM, Bayoumy NM, Al-Gahtani FH. Gene frequency of human platelet alloantigens-1 to -6 and -15 in Saudi blood donors. *Transfus Med.* 2016;26(3):220–4.
41. Halle L, Bach KH, Martageix C, Bianchi F, Lê T Kim T, Morel-Kopp MC i sur. Eleven human platelet systems studied in the Vietnamese and Ma'ohis Polynesian populations. *Tissue Antigens.* 2004;63(1):34–40.
42. Seo DH, Park SS, Kim DW, Furihata K, Uenof I, Han KS. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfus Med.* 1998;8(2):129–32.
43. Husebekk A, El Ekiaby M, Gorgy G, Killie MK, Uhlin-Hansen C, Salma W i sur. Foetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia in Egypt: human platelet antigen genotype frequencies and antibody detection and follow-up in pregnancies. *Transfus Apher Sci.* 2012;47(3):277–82.
44. Tomicic M, Bingulac-Popovic J, Drazic V, Hundrić-Hašpl Ž. Frequency of HPA-15a and HPA-15b (Gov a/b) human platelet alloantigens in the Croatian population. *Arch Med Res.* 2006;37(1):172–4.
45. Marušić M. Geni i antigeni tkivne podudarnosti. U: Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M VD. *Imunologija*, šesto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2004;105–22.
46. Mcfarland JG. Platelet immunology and alloimmunization. U: Simon TL, Dzik WH, Snyder E, Stowell CP SR. *Rossi's Principles of Transfusion Medicine*, 5th ed. Chichester: Wiley & Sons. 2016;215–26.
47. Kjeldsen-Kragh J, Ahlen MT. Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia – The role of the HLA-DRB3*01:01 allele for HPA-1a-immunisation and foetal/neonatal outcome. *Transfus Apher Sci.* 2020;59(1):102707.
48. Cruz Tapias P, Castiblanco J, Anaya JM. Major Histocompatibility Complex: Antigen processing and presentation [Internet]. U: Anaya JM, Shoenfeld Y, Villarraga AR, Levy RA Cervera R. *Autoimmunity: from Bench to Bedside* [Internet]. 2013;169–85. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459467/>
49. IPD-IMGT/HLA Database. [Internet]. Dostupno na: <https://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>
50. Mehra NK, Kaur G. MHC-based vaccination approaches: Progress and perspectives.

Expert Rev Mol Med. 2003;5(7):1–17.

51. Kindt TJ, Osborne BA. Major Histocompatibility Complex. U: Kindt TJ, Osborne BA. Kuby Immunology, 6th ed. New York: WH Freeman. 2006;161–79.

52. Walsh EC, Mather KA, Schaffner SF, Farwell L, Daly MJ, Patterson N i sur. An integrated haplotype map of the human major histocompatibility complex. *Am J Hum Genet.* 2003;73(3):580–90.

53. Bodmer WF. The HLA system: Structure and function. *J Clin Pathol.* 1987;40(9):948–58.

54. Joglekar AV, Li G. T cell antigen discovery. *Nat Methods.* 2021;18(8):873–80.

55. Blood groups ISBT [Internet]. Dostupno na: <https://www.isbtweb.org/resource/tableofbloodgroupsystems.html>

56. Landsteiner K. Ueber Agglutinationser-scheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wien Clin Wschr.* 1901;14:1132–4.

57. Bhende YM, Deshpande CK, Bhatia HM, Sanger R, Race RR, Morgan WTJ i sur. A “new” blood-group character related to the ABO system. *Lancet.* 1952;1:903–4.

58. Dean L. The ABO blood group. U: Dean L. *Blood Groups and Red Cell Antigens.* Bethesda: NCBI. 2005.

59. Curtis BR, Edwards JT, Hessner MJ, Klein JP, Aster RH. Blood group A and B antigens are strongly expressed on platelets of some individuals. *Blood.* 2000;96(4):1574–81.

60. Gandhi MJ, Strong DM, Whitaker BI, Petrisli E. A brief overview of clinical significance of blood group antibodies. *Immunohematology.* 2018;34(1):4–6.

61. Ewald DR, Sumner SCJ. Blood Type Biochemistry and Human Disease. *Rev Syst Biol Med.* 2016; 8(6): 517–535.

62. Wang Z, Liu L, Ji J, Zhang J, Yan M, Zhang J i sur. Abo blood group system and gastric cancer: A case-control study and meta-analysis. *Int J Mol Sci.* 2012;13(10):13308–21.

63. Atkinson JB, Tanley PC, Wallas CH. Loss of blood group A in acute leukemia. Morphologic and biochemical studies of red cells. *Transfusion.* 1987;27(1):45-8.

64. O’Donnell J, Laffan MA. The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. *Transfus Med.* 2001;11(4):343–51.

65. Alexander KS, Zakai NA, Gillett S, McClure LA, Wadley V, Unverzagt F i sur. ABO Blood Type and cognition. *Neurology.* 2014;1271–6.

66. Yamamoto F, Cid E, Yamamoto M, Blancher A. ABO Research in the Modern Era of Genomics. *Transfus Med Rev.* 2012;26(2):103–18.

67. Abegaz SB. Human ABO Blood Groups and Their Associations with Different

Diseases. Biomed Res Int. 2021;2021.

68. Hakomori SI. Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: Their changes associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 1999;1473(1):247–66.

69. Kjeldsen-kragh J, Titze TL, Lie BA, Vaage JT, Kjær M. HLA-DRB3 * 01 : 01 exhibits a dose-dependent impact on HPA-1a antibody levels in HPA-1a – immunized women. *Blood Adv.* 2019;3(7):1–4.

70. Kjeldsen-Kragh J, Fergusson DA, Kjaer M, Lieberman L, Greinacher A, Murphy MF i sur. Fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia: A systematic review of impact of HLA-DRB3*01:01 on fetal/neonatal outcome. *Blood Adv.* 2020;4(14):3368–77.

71. Gruel Y, Boizard B, Daffos F, Forestier F, Caen J, Wautier JL. Determination of platelet antigens and glycoproteins in the human fetus. *Blood.* 1986;68(2):488–92.

72. Davoren A, Curtis BR, Aster RH, McFarland JG. Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion.* 2004;1;44(8):1220–5.

73. Kamphuis MM, Tiller H, Van Den Akker ES, Westgren M, Tiblad E, Oepkes D. Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: Management and Outcome of a Large International Retrospective Cohort. *Fetal Diagn Ther.* 2017 May 1;41(4):251–7.

74. Spencer JA, Burrows RF. Feto-maternal alloimmune thrombocytopenia: A literature review and statistical analysis. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol.* 2001;41(1):45–55.

75. Kamphuis MM, Paridaans NP, Porcelijn L, Lopriore E, Oepkes D. Incidence and Consequences of Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: A Systematic Review. *Pediatrics.* 2014;133(4):715–21.

76. Tomac G, Gojčeta K, Grizelj R, Coen Herak D, Baršić Ostojić S, Golubić Čepulić B. Severe intracranial haemorrhage in neonatal alloimmune thrombocytopenia due to antibodies against human platelet antigen 1b: Case report and literature review. *Transfus Med.* 2022;32(4):269–75.

77. Kamphuis MM, Paridaans N, Porcelijn L, De Haas M, Van Der Schoot CE, Brand A i sur. Screening in pregnancy for fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia: Systematic review. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2010;117(11):1335–43.

78. Harrington WJ, Sprague CC, Minnich V, Moore CV, Aulvin RC, Dubach R. Immunologic mechanisms in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura. *Ann intern Med.* 1953;(38):433.

79. Mueller-Eckhardt C, Grubert A, Weisheit M, Mueller-Eckhardt G, Kiefel V, Kroll H i

- sur. 348 Cases of Suspected Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia. *Lancet*. 1989;333(8634):363–6.
80. Curtis BR, Ali S, Glazier AM, Ebert DD, Aitman TJ, Aster RH. Isoimmunization against CD36 (glycoprotein IV): Description of four cases of neonatal isoimmune thrombocytopenia and brief review of the literature. *Transfusion*. 2002;42(9):1173–9.
81. Wu G, Zhou Y, Li L, Zhong Z, Li H, Li H i sur. Platelet Immunology in China: Research and Clinical Applications. *Transfus Med Rev*. 2017;31(2):118–25.
82. Ohto H, Miura S, Ariga H, Ishii T, Fujimori K, Morita S i sur. The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens. *Transfus Med*. 2004;14(6):399–408.
83. Turner ML, Bessos H, Fagge T, Harkness M, Rentoul F, Seymour J i sur. Prospective epidemiologic study of the outcome and cost-effectiveness of antenatal screening to detect neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-HPA-1a. *Transfusion*. 2005;45(12):1945–56.
84. Schnaidt M, Wernet D. Platelet-specific antibodies in female blood donors after pregnancy. *Transfus Med*. 2000;10(1):77–80.
85. De Clippel D, Baeten M, Torfs A, Emonds MP, Feys HB, Compernelle V i sur. Screening for HLA antibodies in plateletpheresis donors with a history of transfusion or pregnancy. *Transfusion*. 2014;54(12):3036–42.
86. Masson E, Vidal C, Deschamps M, Bongain S, Thevenin C, Dupont I i sur. Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. *Hum Immunol*. 2013;74(8):946–51.
87. Taaning E. HLA antibodies and fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: Myth or meaningful? *Transfus Med Rev*. 2000;14(3):275–80.
88. Panzer S. Controversy: HLA antibodies responsible for fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia - An update. *Transfus Med Hemotherapy*. 2006;33(6):495–500.
89. Curtis BR, Fick A, Lochowicz AJ, McFarland JG, Ball RH, Peterson J i sur. Neonatal alloimmune thrombocytopenia associated with maternal-fetal incompatibility for blood group B. *Transfusion*. 2008;48(2):358–64.
90. Tiller H, Killie MK, Skogen B, Øian P, Husebekk A. Neonatal alloimmune thrombocytopenia in Norway: Poor detection rate with nonscreening versus a general screening programme. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2009;116(4):594–8.
91. Dalva KB. HLA typing with sequence-specific oligonucleotide primed PCR (PCR-SSO) and use of the Luminex™ technology. *J Transl Med*. 2019;17(1):249.

92. Tao S, Chen S, Hong X, He J, Zhu F. Novel method for simultaneously detecting HPA and HLA antibodies using Luminex microbeads. *J Transl Med.* 2019;17(1):249.
93. Porcelijn L, Huiskes E, Comijs-Van Osselen I, Chhatta A, Rathore V, Meyers M i sur. A new bead-based human platelet antigen antibodies detection assay versus the monoclonal antibody immobilization of platelet antigens assay. *Transfusion.* 2014;54(6):1486–92.
94. Raman L, Armstrong B, Smart E. Principles of laboratory techniques. *ISBT Sci Ser.* 2020;15(S1):81–111.
95. Shaz BH. Pretransfusion testing. U: Hillyer CD, Shaz BH, Zimring JC, Abshire TC. *Transfusion Medicine and Hemostasis: Clinical and Laboratory Aspects*, 1st ed. Oxford: Elsevier Science. 2009. p. 97–101.
96. Petermann R, Bianchi F, Saib L, Ferré N, Francelle N, Oudin O i sur. Severe neonatal thrombocytopenia due to anti-HPA-4b alloantibodies: Third report described in a Caucasian mother. *Transfusion.* 2024;64(6):1167–70.
97. Jallu V, Beranger T, Bianchi F, Casale C, Chenet C, Ferre N i sur. Cab4b, the first human platelet antigen carried by glycoprotein IX discovered in a context of severe neonatal thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* 2017;15(8):1646–54.
98. Railton D, Brown J, Brown C, Williamson LM, Navarrete C. On investigation of markers that may influence alloantibody responses to HPA-1a. *Transfus Med.* 2001;10(4):328–9.
99. Sukati H, Bessos H, Barker RN, Urbaniak SJ. Characterization of the alloreactive helper T-cell response to the platelet membrane glycoprotein IIIa (integrin- β 3) in human platelet antigen-1a alloimmunized human platelet antigen-1b1b women. *Transfusion.* 2005;45(7):1165–77.
100. Grubic Z, Maskalan M, Stingl Jankovic K, Burek Kamenaric M, Zunec R. Mapping the Human Leukocyte Antigen Diversity among Croatian Regions: Implication in Transplantation. *J Immunol Res.* 2021;2021:1–12.
101. Delbos F, Bertrand G, Croisille L, Ansart-Pirenne H, Bierling P, Kaplan C. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: Predictive factors of intracranial hemorrhage. *Transfusion.* 2016;56(1):59–66.
102. Panzer S, Auerbach L, Cechova E, Fischer G, Holensteiner A, Kittl EM i sur. Maternal alloimmunization against fetal platelet antigens: a prospective study. *Br J Haematol.* 1995;90(3):655–60.
103. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Kroll H, Mueller-Eckhardt G. HLA-DRw6, a new immune response marker for immunization against the platelet alloantigen Bra. *Vox Sang.*

1989;57(1):90–1.

104. de Vos TW, Porcelijn L, Hofstede-van Egmond S, Pajkrt E, Oepkes D, Lopriore E i sur. Clinical characteristics of human platelet antigen (HPA)-1a and HPA-5b alloimmunised pregnancies and the association between platelet HPA-5b antibodies and symptomatic fetal neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2021;195(4):595–603.

105. Ghevaert C, Campbell K, Walton J, Smith GA, Allen D, Williamson LM i sur. Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion.* 2007;47(5):901–10.

106. Schechter Y, Zeides I, Shalev E, Sharon R. Neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Harefuah.* 1994;127(12).

107. Tomičić M, Golubić-Čepulić B, Gojčeta K, Ivanković Z, Dogić V, Hundrić-Hašpl Ž. Neonatal alloimmune thrombocytopenia in Croatia in 1997–2007. Vol. 130, *Liječ Vjes.* 2008;130(7-8):183–6.

108. Krivec JL, Tanasič T, Đorđević J, Fidler P, Gantar IŠ, Bregar AT i sur. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: Review article and retrospective analysis of clinical and laboratory characteristics of patients in Slovenia between 1996 and 2016. *Zdr Vestn.* 2019;88(3–4):125–42.

109. Ahlen MT, Heide G, Husebekk A, Skogen B, Kjeldsen-Kragh J, Stuge TB. The prevalence of HPA-1a alloimmunization and the potential risk of FNAIT depend on both the DRB3*01:01 allele and associated DR-DQ haplotypes. *Scand J Immunol.* 2020;92(1):1–12.

110. Maslanka K, Guz K, Zupanska B. Antenatal screening of unselected pregnant women for HPA-1a antigen, antibody and alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang.* 2003;85(4):326–7.

111. L'Abbé D, Tremblay L, Goldman M, Décary F, Chartrand P. Alloimmunization to platelet antigen HPA-1a (Zwa): association with HLA-DRw52a is not 100%. *Transf Med.* 1992;2(3):251–251.

112. Wienzek-Lischka S, König I, Papenkort EM, Hackstein H, Santoso S, Ulrich Sachs UJ i sur. HLA-DRB3*01:01 is a predictor of immunization against human platelet antigen-1a but not of the severity of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion.* 2017;57(3):3553–540.

113. Kjeldsen-Kragh J, Bengtsson J. Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia—New Prospects for Fetal Risk Assessment of HPA-1a–Negative Pregnant Women. *Transfus Med Rev.* 2020;34(4):270–6.

114. Levine P. The protective action of ABO incompatibility on Rh isoimmunization and

- Rh hemolytic disease— theoretical and clinical implications. *J Med Educ.* 1959;34(4):418.
115. Zwiers C, Koelewijn JM, Vermij L, van Sambeek J, Oepkes D, de Haas M i sur. ABO incompatibility and RhIG immunoprophylaxis protect against non-D alloimmunization by pregnancy. *Transfusion.* 2018;58(7):1611–7.
116. Ahlen MT, Husebekk A, Killie MK, Kjeldsen-Kragh J, Olsson ML, Skogen B. The development of severe neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-HPA-1a antibodies is correlated to maternal ABO genotypes. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012.
117. Miserre L, Wienzek-Lischka S, Mann A, Cooper N, Santoso S, Ehrhardt H i sur. ABO Incompatibility between the Mother and Fetus Does Not Protect against Anti-Human Platelet Antigen-1a Immunization by Pregnancy. *J Clin Med.* 2022;11(22).
118. Ogasawara K, Ueki J, Takenaka M, Furihata K. Study on the expression of ABH antigens on platelets. *Blood.* 1993;82(3):993–9.
119. Habibi B, Bretagne M, Bretagne Y, Forestier F, Daffos F. Blood group antigens on fetal red cells obtained by umbilical vein puncture under ultrasound guidance: A rapid hemagglutination test to check for contamination with maternal blood. *Pediatr Res.* 1986;20(11):1082–4.
120. Goto S, Hoshino M, Tomoda Y, Ishizuka N. Innumoelectron microscopy of the human chorionic villus in search of blood group A and B antigens. *Lab Invest.* 1976;35(6):530–6.
121. Sabbatinelli G, Fantasia D, Palka C, Morizio E, Alfonsi M, Calabrese G. Isolation and enrichment of circulating fetal cells for nipa: An overview. *Diagnostics.* 2021;11(12):1–11.
122. Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, Busch MP, Norris PJ, Steele WR i sur. The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: Implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion.* 2009;49(9):1825–35.
123. Powers A, Christopher P, Dzik WH, Saidman SL, Lee H. Testing only donors with a prior history of pregnancy or transfusion is a logical and cost-effective transfusion-related acute lung injury prevention strategy. *Transfusion.* 2008;48:2549–58.
124. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovic-Tourniaire P, Moreau T. Rate of Pregnancy-Related Relapse in Multiple Sclerosis. *Surv Anesthesiol.* 1999;43(1):25–6.
125. Østensen M, Villiger PM. The remission of rheumatoid arthritis during pregnancy. *Semin Immunopathol.* 2007;29(2):185–91.
126. Kinder JM, Stelzer IA, Arck PC, Way SS. Immunological implications of pregnancy-induced microchimerism. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(8):483–94.
127. Erlebacher A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nat Rev*

Immunol. 2013;13(1):23–33.

128. Krabchi K, Gros-Louis F, Yan J, Bronsard M, Massé J, Forest JC i sur. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin Genet.* 2001;60(2):145–50.

129. Jiang TT, Chaturvedi V, Ertelt JM, Kinder JM, Dayna R, Valent AM i sur. Regulatory T cells: new keys for further unlocking the enigma of fetal tolerance and pregnancy complications. *J Immunol.* 2015;192(11):4949–56.

130. Dahl J, Skogen B, Kjaer M, Husebekk A, Kjeldsen-Kragh J, Tiller H. A combined effect of anti-HPA-1a and anti-HLA Class I in pregnancy? *Transfusion.* 2020;60(9):2121–9.

131. Taaning E, Petersen S, Reinholdt J, Bock J, Svejgaard A. Neonatal Immune Thrombocytopenia Due to Allo-or Autoantibodies: Clinical and Immunological Analysis of 83 Cases. *Platelets.* 1994;5(1):53–8.

132. Kazemi MH, Malakootikhah F, Momeni-Varposhti Z, Falak R, Delbandi AA, Tajik N. Human platelet antigen 1-6, 9 and 15 in the Iranian population: An anthropological genetic analysis. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-10.

133. Bhatti FA, Uddin M, Ahmed A, Bugert P. Human platelet antigen polymorphisms (HPA-1, -2, -3, -4, -5 and -15) in major ethnic groups of Pakistan. *Transfus Med.* 2010;20(2):78-87.

134. Conti F, Bertrand G, Dezan M i sur. Molecular HPA genotyping by microarray in Brazilian blood donors. *Transfusion.* 2014;54(2):405-411.

8. SAŽETAK

Imunizacija majki na specifične trombocitne antigene (engl. *human platelet antigens*, HPA) i/ili humane leukocitne antigene (engl. *human leukocyte antigens*, HLA) koje je dijete naslijedilo od oca, uz znanstveno ima i kliničko značenje za majku i novorođenče, s obzirom na to da anti-HPA i anti-HLA protutijela mogu uzrokovati spontane pobačaje te fetalnu/neonatalnu aloimunu trombocitopeniju (eng. *fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia*, FNAIT). Istraživanja su pokazala da se ne imuniziraju sve majke s nepodudarnostima u antigenima HPA s djetetom, a razlog tome mogli bi biti specifični čimbenici majčinog imunskog sustava.

Ciljevi ovog istraživanja bili su odrediti alele i genotipove gena HPA u ispitanica i novorođenčadi te analizirati broj i specifičnost nepodudarnosti u antigenima HPA i ABO u parovima majka/novorodenče. Nadalje, jedan od ciljeva bio je testirati sve ispitanice na prisutnost protutijela anti-HPA i odrediti njihovu specifičnost, a onim ispitanicama s dokazanom nepodudarnošću u antigenima HPA s novorođenčetom i ispitanicama s dokazanim protutijelima anti-HPA odrediti gene *HLA-DRB1/3/4/5*. U skupini ispitanica čija su djeca razvila trombocitopeniju cilj je bio analizirati podatke o protutijelima anti-HPA, genima HPA ispitanica i novorođenčadi te genima *HLA-DRB1/3/4/5*. Posljedni cilj u ovom istraživanju bio je ispitati povezanost nepodudarnosti u antigenima sustava ABO i fetomaterne aloimunizacije na antigene HPA.

Rezultati provedenog istraživanja ukazali su na podjednaku raspodjelu alela HPA u usporedbi s 12 navedenih populacija Europe, dok se raspodjela alela HPA očekivano razlikovala u usporedbi s populacijama svijeta.

Četiri najučestalije nepodudarnosti uočene su u antigenima HPA-1b, -5b, -2b i -15a.

Protutijela anti-HPA dokazana su u samo 2,2 % ispitanica, a najučestalije protutijelo bilo je anti-HPA-5b, dok protutijela anti-HPA-1a u ovom istraživanju nisu dokazana niti u jednom slučaju. Učestalost protutijela anti-HLA razreda I iznosila je 18,2 %. Istraživanjem je dokazano da aleli *HLA-DRB1*15:01* i *HLA-DRB5*01:01* umanjuju, a aleli *DRB1*13:01* i *HLA-DRB3*01:01* uvećavaju rizik od fetomaterne aloimunizacije na antigene HPA.

U skupini ispitanica čija je novorođenčad imala FNAIT, protutijela anti-HPA-1a nisu bila najučestalija, već su u najvećeg broja ispitanica dokazana protutijela anti-HPA-5b. U navedenoj skupini uočeno je da su aleli *HLA-DRB3*01:01* i *HLA-DRB3*02:02* statistički značajno češće bili prisutni u ispitanica s protutijelima anti-HPA-1a odnosno anti-HPA-5b.

Nije nađena statistički značajna povezanost krvne grupe ABO ispitanica niti povezanost nepoudarnosti u antigenima ABO i HPA u parovima majka/novorodjenče i fetomaternalne aloimunizacije ispitanica na antigene HPA i HLA te također nije bilo statistički značajnih razlika u raspodjeli prema broju poroda ispitanica.

Ovim istraživanjem po prvi je puta dokazana statistički značajna povezanost protutijela anti-HLA razreda I i fetomaternalne aloimunizacije na antigene HPA-5b.

Iz rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da je fetomaternalna aloimunizacija na antigene HPA povezana s genima *HLA-DRB1/3/4/5*. Također, polimorfizam gena *HLA-DRB1/3/4/5* povezan je s fetomaternalnom aloimunizacijom na pojedini specifični antigen HPA.

Rezultati ovog istraživanja omogućiti će bolje razumijevanje mehanizma imunizacije majke na antigene HPA i HLA te utvrđivanje učestalosti i kliničkog značenja pojedinih protutijela anti-HPA.

9. SUMMARY

Mothers' alloimmunization to specific platelet antigens (HPA) and/or human leukocyte antigens (HLA) that a child inherited from a father is not only of scientific significance but also clinical significance for both mother and the child. Anti-HPA and anti-HLA antibodies can cause spontaneous abortions and fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT).

Studies have shown that not all mothers had anti-HPA antibodies present and it could be because of specificity of one's immune system.

The goals of this study have been to determine the mother's and child's HPA alleles and genotypes and to analyze the number and the specificity of mismatches in HPA and ABO antigens present in mother/child pairs.

Furthermore, all mothers were to be screened for anti-HPA antibody specificity and tested for the HPA genes, followed by identification of *HLA-DRB1/3/4/5* genes only in the group of mothers with anti-HPA antibodies and in the group of mothers with HPA mismatches.

For another group which included mothers whose children had been treated for FNAIT, the goal was to analyze previous testing for anti-HPA antibodies, HPA genes, and *HLA-DRB1/3/4/5* genes. The final goal of the study was to analyze the correlation of HPA mismatches and ABO mismatches to fetomaternal alloimmunization to HPA antigens.

The results have shown equal distribution of HPA alleles in 12 European populations in comparison to the distribution of HPA alleles in our study, while the distribution of HPA alleles differed in comparison to world populations.

Four most frequent HPA mismatches have been found in antigens HPA-1b, -5b, -2b, and -15a.

Antiplatelet antibodies have been detected in 2,2 % of mothers; the most frequent were anti-HPA-5b antibodies. Anti-HPA-1a antibodies have not been detected in this group of mothers.

The frequency of class I anti-HLA antibodies was 18,2 %.

This study confirmed that *HLA-DRB1*15:01* and *HLA-DRB5*01:01* alleles decrease, whereas *DRB1*13:01* and *HLA-DRB3*01:01* alleles increase the risk of fetomaternal alloimmunization to HPA antigens.

In the group of mothers whose children had FNAIT, anti-HPA-1a antibodies were not the most frequent antibodies. The largest number of mothers had detectable anti-HPA-5b antibodies in sera. In this group of mothers, *HLA-DRB3*01:01* and *HLA-DRB3*02:02* alleles

Summary

were statistically more frequently present in mothers with anti-HPA-1a and anti-HPA-5b respectively.

The correlation between ABO blood group, mismatches in HPA, ABO antigens, previous deliveries and fetomaternal alloimmunization were not statistically significant.

This is the first study with a statistically significant correlation between class I anti-HLA antibodies and fetomaternal alloimmunization to HPA-5b antigens.

In conclusion, fetomaternal alloimmunization to HPA antigens is in correlation to *HLA-DRB1/3/4/5* genes. Furthermore, the polymorphism of *HLA-DRB1/3/4/5* genes is in correlation to fetomaternal alloimmunization to specific HPA antigens.

The results of this study will provide new insights into the pathophysiology of alloimmunization to HPA and HLA antigens and aid in determining the incidence and clinical significance of certain anti-HPA and HLA antibodies.

10. PRILOZI

10.1. Raspodjela alela gena HPA u populacijama Europe

Prilog 1. Tablica raspodjele alela HPA u populacijama Europe

POPULACIJA	HPA -1a	HPA -1b	HPA -2a	HPA -2b	HPA -3a	HPA -3b	HPA -4a	HPA -4b	HPA -5a	HPA -5b	HPA -6a	HPA -6b	HPA -9a	HPA -9b	HPA -15a	HPA -15b	Ret.
Hrvatska*	0,82	0,18	0,89	0,11	0,57	0,43	1,00	0,00	0,86	0,14	1,00	0,00	0,99	0,01	0,51	0,49	-
Hrvatska**	0,78	0,22	0,89	0,11	0,59	0,41	0,99	0,01	0,84	0,14	1,00	0,00	0,99	0,01	0,52	0,48	-
Slovenija	0,81	0,19	0,88	0,12	0,58	0,42	0,99	0,01	0,93	0,07	-	-	-	-	-	-	15
Srbija	0,87	0,13	0,92	0,08	0,61	0,39	0,10	0,00	0,89	0,11	1,00	0,00	0,99	0,01	0,47	0,53	17
Makedonija	0,86	0,14	0,85	0,15	0,58	0,42	-	-	0,90	0,10	-	-	-	-	-	-	28
Finska	0,86	0,14	0,91	0,09	0,59	0,41	-	-	0,95	0,05	0,98	0,02	-	-	-	-	31
Danska	0,83	0,17	0,92	0,08	0,63	0,37	1,00	0,00	0,92	0,08	-	-	-	-	-	-	33
Češka	0,83	0,17	0,90	0,10	0,59	0,41	-	-	0,93	0,07	-	-	-	-	-	-	34
Austrija	0,85	0,15	0,92	0,08	0,61	0,39	-	-	0,89	0,11	-	-	-	-	-	-	36
Poljska	0,87	0,13	0,90	0,10	0,59	0,41	1,00	0,00	0,94	0,06	-	-	-	-	-	-	27
Švicarska	0,83	0,17	0,90	0,10	0,67	0,33	-	-	0,89	0,11	-	-	-	-	-	-	30
UK	0,84	0,16	0,93	0,07	0,63	0,37	1,00	0,00	0,91	0,09	1,00	0,00	1,00	0,00	-	-	35
Njemačka	0,80	0,20	0,91	0,09	0,57	0,43	1,00	0,00	0,92	0,08	-	-	-	-	0,52	0,48	32
Njemačka***	0,86	0,14	0,87	0,13	0,61	0,39	0,99	0,01	0,91	0,09	-	-	-	-	0,47	0,53	32
Norveška	0,87	0,13	0,94	0,06	0,47	0,53	1,00	0,00	0,93	0,07	-	-	-	-	0,49	0,51	29

Kratice: * - rezultati za ispitivanje u ovom istraživanju, ** - rezultati za novorođenčad u ovom istraživanju, *** - rezultati za populaciju turskog porijekla

10.2. Raspodjela alela gena HPA u populacijama svijeta

Prilog 2. Tablica raspodjele alela HPA u populacijama svijeta

POPULACIJA	HPA -1a		HPA -1b		HPA -2a		HPA -2b		HPA -3a		HPA -3b		HPA -4a		HPA -4b		HPA -5a		HPA -5b		HPA -6a		HPA -6b		HPA -9a		HPA -9b		HPA -15a		HPA -15b		Rel.
	0,75	0,25	0,82	0,18	0,68	0,32	1,00	0,00	0,86	0,14	1,00	0,00	0,91	0,09	1,00	0,00	0,80	0,20	1,00	0,00	0,98	0,02	0,99	0,01	1,00	0,00	1,00	0,00	0,98	0,02	0,51	0,49	
Maroko (Berberi)	0,90	0,10	0,88	0,12	0,59	0,41	1,00	0,00	0,91	0,09	1,00	0,00	0,91	0,09	1,00	0,00	0,91	0,09	1,00	0,00	0,91	0,09	1,00	0,00	0,91	0,09	1,00	0,00	0,91	0,09	0,46	0,54	132
Iran	0,80	0,20	0,71	0,29	0,65	0,35	0,99	0,01	0,80	0,20	1,00	0,00	0,80	0,20	1,00	0,00	0,80	0,20	1,00	0,00	0,80	0,20	1,00	0,00	0,80	0,20	1,00	0,00	0,80	0,20	0,47	0,53	40
Saudijska Arabija	0,76	0,24	0,77	0,23	0,57	0,43	0,93	0,07	0,86	0,14	-	-	0,86	0,14	-	-	0,86	0,14	-	-	0,86	0,14	-	-	0,86	0,14	-	-	0,86	0,14	-	-	26
Bahrein	0,78	0,22	0,86	0,14	0,75	0,25	1,00	0,00	0,80	0,20	1,00	0,00	0,80	0,20	1,00	0,00	0,80	0,20	1,00	0,00	0,80	0,20	1,00	0,00	0,80	0,20	1,00	0,00	0,80	0,20	0,51	0,49	37
Tunis	0,79	0,21	0,87	0,13	0,66	0,34	1,00	0,00	0,84	0,16	-	-	0,84	0,16	-	-	0,84	0,16	-	-	0,84	0,16	-	-	0,84	0,16	-	-	0,84	0,16	0,53	0,47	43
Egipat	0,88	0,12	0,92	0,08	0,69	0,31	1,00	0,00	0,90	0,10	-	-	0,90	0,10	-	-	0,90	0,10	-	-	0,90	0,10	-	-	0,90	0,10	-	-	0,90	0,10	0,59	0,41	133
Pakistan	0,99	0,01	0,95	0,05	0,59	0,41	0,99	0,01	0,99	0,01	0,99	0,01	0,99	0,01	0,99	0,01	0,99	0,01	0,99	0,01	0,99	0,01	0,99	0,01	0,99	0,01	0,99	0,01	0,99	0,01	0,53	0,47	23
Kina (Han Kinezi)	0,99	0,01	0,95	0,05	0,49	0,51	1,00	0,00	0,97	0,03	0,99	0,01	0,97	0,03	0,99	0,01	0,97	0,03	0,99	0,01	0,97	0,03	0,99	0,01	0,97	0,03	0,99	0,01	0,97	0,03	0,52	0,48	41
Vijetnam	0,99	0,01	0,90	0,10	0,59	0,41	0,99	0,01	-	-	0,97	0,03	-	-	0,97	0,03	-	-	0,97	0,03	-	-	0,97	0,03	-	-	0,97	0,03	-	-	0,97	0,03	20,25
Japan	0,95	0,05	0,97	0,03	0,60	0,40	0,99	0,01	0,98	0,02	0,99	0,01	0,98	0,02	0,99	0,01	0,98	0,02	0,99	0,01	0,98	0,02	0,99	0,01	0,98	0,02	0,99	0,01	0,98	0,02	0,57	0,43	24
Burma	0,99	0,01	0,92	0,08	0,55	0,44	0,99	0,01	0,98	0,02	0,99	0,01	0,98	0,02	0,99	0,01	0,98	0,02	0,99	0,01	0,98	0,02	0,99	0,01	0,98	0,02	0,99	0,01	0,98	0,02	-	-	42
Južna Koreja	0,90	0,10	0,78	0,22	0,60	0,40	1,00	0,00	0,73	0,27	1,00	0,00	0,73	0,27	1,00	0,00	0,73	0,27	1,00	0,00	0,73	0,27	1,00	0,00	0,73	0,27	1,00	0,00	0,73	0,27	0,70	0,30	22
Subsaharska Afrika*	1,00	0,00	0,61	0,39	0,50	0,50	1,00	0,00	0,59	0,41	1,00	0,00	0,59	0,41	1,00	0,00	0,59	0,41	1,00	0,00	0,59	0,41	1,00	0,00	0,59	0,41	1,00	0,00	0,59	0,41	0,67	0,33	22
Subsaharska Afrika**	0,99	0,01	1,00	0,00	0,93	0,07	1,00	0,00	0,75	0,25	-	-	0,75	0,25	-	-	0,75	0,25	-	-	0,75	0,25	-	-	0,75	0,25	-	-	0,75	0,25	-	-	39
Australija***	1,00	0,00	0,96	0,04	0,71	0,29	1,00	0,00	0,96	0,04	-	-	0,96	0,04	-	-	0,96	0,04	-	-	0,96	0,04	-	-	0,96	0,04	-	-	0,96	0,04	-	-	38
Amazonija****	0,85	0,15	0,87	0,13	0,65	0,35	0,99	0,01	0,90	0,10	1,00	0,00	0,90	0,10	1,00	0,00	0,90	0,10	1,00	0,00	0,90	0,10	1,00	0,00	0,90	0,10	1,00	0,00	0,98	0,02	0,53	0,47	134

Kratice: * - rezultati za Kongo, ** - rezultati za populaciju Pigmejaca, *** - rezultati za populaciju Aboridina, **** - rezultati za populaciju Indijanaca

11. ŽIVOTOPIS

Gordana Tomac rođena je 5. siječnja 1981. godine u Zagrebu. Osnovnu školu i XVI. (jezičnu) gimnaziju završila je u Zagrebu. Medicinski fakultet u Zagrebu upisala je 1999. te diplomirala 2005. godine. Dvije godine radila je kao liječnik sekundarac u Sveučilišnoj klinici za dijabetes „Vuk Vrhovec“ te u Kliničkoj bolnici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. Godine 2008. započinje specijalističko usavršavanje iz transfuzijske medicine u Kliničkom bolničkom centru Zagreb gdje 2011. polaže specijalistički ispit. Kao liječnik specijalist radi u odjelu za transfuzijsku medicinu.

Godine 2019. upisala je Poslijediplomski interdisciplinarni studij „Molekularne bioznanosti“ Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu i Sveučilišta u Dubrovniku, područje biomedicine i zdravstva.

Aktivno je sudjelovala na brojnim znanstvenim i stručnim sastancima, kongresima i simpozijima iz područja stručnog interesa. Održala je nekoliko pozvanih predavanja na međunarodnim kongresima i simpozijima te objavila deset znanstvenih radova. Aktivno se služi engleskim i njemačkim jezikom, a pasivno talijanskim.

ČLANSTVO U STRUKOVNIM UDRUGAMA

Članica je Hrvatskog liječničkog zbora te Hrvatskog društva za transfuzijsku medicinu.

POPIS ZNANSTVENIH RADOVA

1. Železnik K, Čitar M, Marić I, Tomac G, Maličev E. Heparin-induced thrombocytopenia: effect of heat inactivation of patient's serum on functional flow cytometric assay results. *Blood Transfus* 2022; doi 10.2450/2022.0045-22
2. Medić MG, Tomac G, Rimac V, Tomšić KZ, Kraljević I, Boban A. Fatal intracranial hemorrhage in patient with thrombocytopenia and positive HIT antibodies after vaccination with ChAdOx1 nCoV-19-VITT without thrombosis? *Thrombosis Research* 2022 Jul;215:55-57. doi 10.1016/j.thromres.2022.05.006
3. Tomac G, Gojčeta K, Grizelj R, Coen Herak D, Barsic Ostojić S, Golubić Čepulić B. Severe intracranial haemorrhage in neonatal alloimmune thrombocytopenia due to antibodies against human platelet antigen 1b: Case report and literature review. *Transfusion Medicine* 2022 June;32(4):269-275. doi 10.1111/tme.12892

4. Liker M, Bojanić I, Plenković F, Lukić M, Tomac G, Raos M, Golubić Ćepulić B. Platelet transfusion practice and related transfusion reactions in a large teaching hospital. *Transfus Clin Biol* 2022 Feb;29(1):37-43
5. Krečak I, Tomac G, Škugor J, Gverić-Krečak V, Pulanić D. In vivo and in vitro cross-reactivity to fondaparinux in a stroke patient with IgG-PF4/heparin antibody-negative delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia. *Blood Transfus* 2020 Jul;18(4):322-325. doi: 10.2450/2020.0037-20
6. Novoselac J, Raos M, Tomac G, Lukic M, Golubić Ćepulić B. K antigens on neonatal red blood cells blocked by anti-K with titer of 32. *Immunohematology*. 2020 Jun;36(2):54-57.
7. Tomac G, Bojanić I, Mazić S, Vidović I, Raos M, Ćepulić BG, Seiwerth RS, Kelečić J, Labar B. Haemolysis, pure red cell aplasia and red cell antibody formation associated with major and bidirectional ABO incompatible haematopoietic stem cell transplantation. *Blood Transfus*. 2018 Jul;16(4):397-404. doi: 10.2450/2017.0322-16
8. Škerk V, Andrasević AT, Andrasević S, Susić E, Dzepina AM, Madarić V, Milutinović S, Krhen I, Perić L, Bagatin J, Corić M, Ferlin D, Cazin I, Tomac G. Intersectoral Coordination Mechanism for the Control of Antimicrobial Resistance (ISKRA). ISKRA guidelines on antimicrobial treatment and prophylaxis of urinary tract infections. Croatian national guidelines. *Lijec Vjesn* 2009; 131:105-18
9. Andrasević AT, Baudoin T, Vukelić D, Matanović SM, Bejuk D, Puzevski D, Abram M, Tesović G, Grgurev Z, Tomac G, Pristas I. Interdisciplinary Section for Antibiotic Resistance Control (ISKRA). ISKRA guidelines on sore throat: diagnostic and therapeutic approach--Croatian national guidelines. *Lijec Vjesn* 2009; 131:181-91
10. Škerk V, Tambić-Andrašević A, Ferinčević R, Tomac G, Škerk V et al. Research on the effectiveness and tolerability of vaginal administration of probiotic *Lactobacillus acidophilus* in women with symptoms of colpitis. *Cro J Infect* 2007; 27:2,81-85

USMENE PREZENTACIJE NA MEĐUNARODNIM SKUPOVIMA

1. Stručni sastanak radne skupine za bolesti tromboze i hemostaze

- Dijagnostika heparin izazvane trombocitopenije.

Zadar, Hrvatska, 19-20.04.2024.

2. Treći dani koagulacije

- pozvano predavanje – Delayed-onset HIT - case report

Zagreb, Hrvatska, 8-9.9.2022.

3. Drugi dani koagulacije

- pozvano predavanje – Refractory HIT – rare or underdiagnosed?

Zagreb, Hrvatska. 9-10.5.2019.

Ocjena rada
u tisku