

Povezanost regije HLA s endemskom nefropatijom i karcinomom urotela gornjega urotrakta u Hrvatskoj

Dittrich, Damir

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:797353>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-15**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Damir Dittrich

**Povezanost regije HLA s endemskom
nefropatijom i karcinomom urotela
gornjega urotrakta u Hrvatskoj**

DISERTACIJA



Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Damir Dittrich

**Povezanost regije HLA s endemskom
nefropatijom i karcinomom urotela
gornjega urotrakta u Hrvatskoj**

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena na Odjelu za tipizaciju tkiva, Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Općoj bolnici "Dr. Josip Benčević" u Slavonskom Brodu.

Voditelji rada: akademik Željko Kaštelan i prof. dr. sc. Zorana Grubić

Zahvaljujem se mentoru akademiku Željku Kaštelanu na vodstvu i iskazanom mi povjerenju pri pisanju disertacije.

Posebno i veliko hvala komentorici prof. dr. sc. Zorani Grubić na bezuvjetnoj podršci, savjetima i pomoći i onda kada je nedostajalo snage i ustrajnosti.

Svojim iskustvom, entuzijazmom, načinom razmišljanja i pristupanja znanstvenom izazovu pružila mi je veliku podršku pri uspješnom dovršetku ovog rada.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. ENDEMSKA NEFROPATIJA	1
1.1.1. Epidemiologija endemske nefropatije	1
1.1.2. Etiologija endemske nefropatije	3
1.1.3. Klinička slika endemske nefropatije	4
1.1.4. Dijagnostički kriteriji endemske nefropatije	5
1.1.5. Liječenje endemske nefropatije.....	11
1.2. KARCINOMI UROTELA GORNJEGA UOTRAKTA (UUC).....	11
1.2.1. Etiologija karcinoma urotela gornjega uotrakta.....	11
1.2.2. Histološki oblici karcinoma urotela gornjega uotrakta.....	12
1.2.3. Stupnjevanje i klasifikacija karcinoma urotela gornjega uotrakta	13
1.2.4. Dijagnoza karcinoma urotela gornjega uotrakta	15
1.2.4.1. Simptomi karcinoma urotela gornjega uotrakta	15
1.2.4.2. Dijagnostičke metode za otkrivanje karcinoma urotela gornjega uotrakta.....	15
1.2.5. Prognoza karcinoma urotela gornjega uotrakta.....	16
1.2.5.1. Preoperativni čimbenici.....	16
1.2.5.2. Postoperativni čimbenici.....	16
1.2.6. Liječenje karcinoma urotela gornjega uotrakta	17
1.2.6.1. Lokalizirana bolest.....	17
1.2.6.2. Proširena bolest.....	18
1.3. GLAVNI SUSTAV TKIVNE PODUDARNOSTI.....	19
1.3.1. Smještaj i organizacija regije sustava HLA	19

1.3.2. Obilježja sustava HLA.....	21
1.3.3. Geni i molekule HLA razreda I	22
1.3.4. Geni i molekule HLA razreda II	23
1.3.5. Uloga gena HLA u imunološkoj reakciji.....	24
1.3.6. Povezanost sustava HLA s karcinogenezom i bolestima bubrega.....	25
2. HIPOTEZA	29
3. CILJEVI	30
3.1. OPĆI CILJEVI	30
3.2. SPECIFIČNI CILJEVI.....	30
4. MATERIJALI I METODE.....	31
4.1. ISPITANICI.....	31
4.1.1. Skupina oboljelih ispitanika.....	31
4.1.2. Skupina članova obitelji EN bolesnika	33
4.1.3. Kontrolna skupina	33
4.2. MATERIJALI	33
4.3. METODE.....	34
4.3.1. Kliničke metode.....	34
4.3.1.1. Dijagnoza EN.....	34
4.3.1.2. Dijagnoza UUC-a.....	35
4.3.1.3. Hematurija	35
4.3.1.4. Citološka analiza urina.....	35
4.3.1.5. Intravenska urografija (IVU).....	35
4.3.1.6. Kompjuterizirana urografija (CTU)	36

4.3.1.7. Magnetska rezonanca (MR)	36
4.3.1.8. Cistoskopija	36
4.3.1.9. Ureteropijeloskopija	37
4.3.2. Tipizacija HLA	37
4.3.2.1. Izolacija DNA	37
4.3.2.2. Određivanje gena i alela HLA metodom lančane reakcije polimerazom i s oligonukleotidnim probama specifičnih sekvenci (PCR-SSO)	37
4.3.2.3. Određivanje gena i alela HLA metodom lančane reakcije polimerazom i početnicama specifičnih sekvenci (PCR-SSP).....	39
4.4. STATISTIČKE METODE.....	39
5. REZULTATI.....	41
5.1. RASPODJELA GENA, ALELA I HAPLOTIPOVA LOKUSA HLA-A, -B i - DRB1 UNUTAR SKUPINE BOLESNIKA S ENDEMSKOM NEFROPATIJOM.....	42
5.1.1. Raspodjela gena lokusa HLA-A, -B i -DRB1	42
5.1.2. Raspodjela alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1	45
5.1.3. Raspodjela haplotipova HLA.....	50
5.1.3.1. Raspodjela haplotipova HLA-B~DRB1 (niska rezolucija)	50
5.1.3.2. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija)	52
5.1.3.3. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija)	53
5.2. RASPODJELA GENA, ALELA I HAPLOTIPOVA LOKUSA HLA-A, -B i -DRB1 UNUTAR PODSKUPINA BOLESNIKA S OBZIROM NA PRISUTNOST KARCINOMA UROTELA GORNJEGA UROTRAKTA	56

5.2.1. Raspodjela gena lokusa HLA-A, -B i -DRB1	56
5.2.2. Raspodjela alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1	60
5.2.3. Raspodjela haplotipova HLA.....	65
5.2.3.1. Raspodjela haplotipova HLA-B~DRB1 (niska rezolucija)	65
5.2.3.2. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija)	67
5.2.3.3. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija)	68
5.3. RASPODJELA GENA, ALELA I HAPLOTIPOVA LOKUSA HLA-A, -B i -DRB1 UNUTAR PODSKUPINA BOLESNIKA S ENDEMSKOM NEFROPATIJOM S OBZIROM NA ŽIVOTNU DOB POJAVE BOLESTI (PRIJE I NAKON 65. g. ŽIVOTA).....	71
5.3.1. Raspodjela gena lokusa HLA-A, -B i -DRB1	71
5.3.1. Raspodjela alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1	72
5.3.3. Raspodjela haplotipova HLA.....	74
5.3.3.1. Raspodjela haplotipova HLA-B~DRB1 (niska rezolucija)	74
5.3.3.2. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija)	76
5.3.3.3. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija)	77
5.4. RASPODJELA GENA ALELA I HAPLOTIPOVA LOKUSA HLA-A, -B i - DRB1 UNUTAR PODSKUPINA BOLESNIKA S ENDEMSKOM NEFROPATIJOM S OBZIROM NA PREŽIVLJENJE (MANJE ILI VIŠE OD 5 GODINA)	79
5.4.1. Raspodjela gena lokusa HLA-A, -B i -DRB1	79
5.4.2. Raspodjela alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1	81
5.4.3. Raspodjela haplotipova HLA.....	82
5.4.3.1. Raspodjela haplotipova HLA-B~DRB1 (niska rezolucija)	82
5.4.3.2. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija)	84

5.4.3.3. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija)	85
5.5. RASPODJELA GENA, ALELA I HAPLOTIPOVA LOKUSA HLA-A, -B I - DRB1 UNUTAR SKUPINE BOLESNIKA S ENDEMSKOM NEFROPATIJOM I KARCINOMOM UROTELA GORNJEGA UROTRAKTA S OBZIROM NA PREŽIVLJENJE	89
5.5.1. Raspodjela gena lokusa HLA-A, -B i -DRB1	89
5.5.2. Raspodjela haplotipova HLA.....	91
5.5.2.1. Raspodjela haplotipova HLA-B~DRB1 (niska rezolucija)	91
5.5.2.2. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija)	92
5.6. ANALIZA GENA/ALELA/HAPLOTIPOVA LOKUSA HLA-A, -B i -DRB1 MEĐU ZDRAVIM SRODNICIMA BOLESNIKA S ENDEMSKOM NEFROPATIJOM.....	93
6. RASPRAVA	94
7. ZAKLJUČCI.....	104
8. SUMMARY	105
9. SAŽETAK	106
10. LITERATURA	107
11. ŽIVOTOPIS.....	124

Popis oznaka i kratica

α -1MCR	omjer alfa1-mikroglobulina i kreatinina
α -1M/UAE	omjer mokraćnog alfa1-mikroglobulina i albumina
AA-DNA	dezoksiribonukleinska kiselina adukti aristolohične kiseline
AAN	nefropatija aristolohične kiseline
BcL-2	(engl. B-cell lymphoma - 2)
CELA1	Chymotrypsin-like elastase family member 1
CIS	karcinom "in situ"
CKD	(engl. Chronic Kidney Disease); kronična bubrežna bolest
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease - Epidemiology Collaboration
CT	kompjuterizirana tomografija
eGFR	(engl. estimated glomerular filtration rate); procjena brzine glomerularne filtracije
EN	endemska nefropatija
ERSD	(engl. End-stage Renal Disease); terminalni stadij bubrežne bolesti
HLA	(engl. Human Leukocyte Antigen); Humani leukocitni antigeni
HSP	(engl. Heat Shock Proteins); proteini toplinskog šoka
HSPG2	Heparan Sulfate Proteoglycan 2
HWE	(engl. Ewens-Watterson homozygosity)

IgAN	Imunoglobulin A nefropatija
IVU	intravenska urografija
KBB	kronična bubrežna bolešt
KCNK5	Potassium channel subfamily K member 5
KDIGO	The Kidney Disease Improving Global Outcomes
KDOQI	(engl. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative)
Ki-67	(engl. Marker Of Proliferation Ki-67); biljeg stanične proliferacije -67
LD	(engl. linkage disequilibrium); neravnoteža udruživanja
LT-β	(engl. Lymphotoxin)
MHC	(engl. Major Histocompatibility Complex); Glavni sustav tkivne podudarnosti
MPO-AAV	(engl. Myeloperoxidase associated vasculities)
MR	magnetska rezonanca
MSCT	višeslojna kompjuterizirana tomografija
NK	(engl. Natural Killer); Stanice prirodne ubojice
NU	nefroureterektomija
PCR-SSO	(engl. Polymerase Chain Reaction – Sequence-Specific Oligonucleotides)
PCR-SSP	(engl. Polymerase Chain Reaction – Sequence-Specific Primers)
PR3-AAV	(engl. Proteinase 3 associated vasculitis)

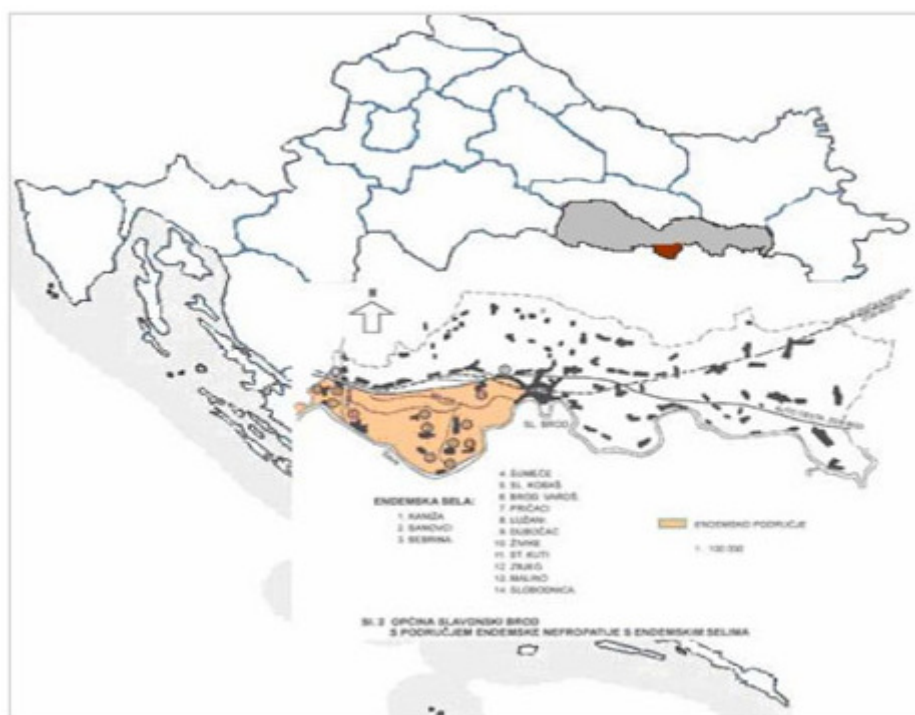
RNU	radikalna nefroureterektomija
RON	(engl. Recepteur d'Origine Nantais)
SEER	(engl. Surveillance, Epidemiology and End Results)
SU	segmentalna ureterektomija
TAP1, TAP2	(engl. Transporters Associated with antigen Processing)
TINU	(engl. Tubulointerstitial nephritis and uveitis)
TNF	(engl. Tumor Necrosis Factor)
TNM	(engl. Tumor, Nodus, Metastasis); klasifikacija
UUC	(engl. upper tract urothelial carcinoma); karcinom urotela gornjega urotrakta
WHO	(engl. World Health Organizaton); Svjetska zdravstvena organizacija

1. UVOD

1.1. ENDEMSKA NEFROPATIJA

1.1.1. Epidemiologija endemske nefropatije

Endemska nefropatija (EN) je klasificirana kao tubulointersticijska kronična bolest bubrega koja se očituje sporim kliničkim tijekom, a završna faza bolesti je bubrežna insuficijencija i potreba za hemodijalizom. (1) Bolest se javlja u seoskim sredinama smještenim uz tokove rijeka podunavskog sliva u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Srbiji, Bugarskoj i Rumunjskoj. U Hrvatskoj se endemsko žarište bolesti nalazi u Brodsko-posavskoj županiji na obali rijeke Save (slika 1), zapadno od Slavonskog Broda i uključuje četrnaest sela, a to su Slavonski Kobaš, Kaniža, Bebrina, Banovci, Stupnički Kuti, Šumeće, Dubočac, Zbjeg, Živike, Pričac, Slobodnica, Malino, Lužani i Brodski Varoš. (2) Nije zabilježena među stanovništvom urbanih sredina, a stanovništvo susjednih sela uz endemsko područje nije pogođeno bolešću. Obolijevaju članovi unutar obitelji i to u dobi od 45 do 60 godina i ne mlađi od 15 godina, ali nije nasljednog karaktera. (3, 4)



Slika 1. Endemsko područje endemske nefropatije u Brodsko-posavskoj županiji u RH

Prvi dokazani slučaj bolesti opisan je 1949. g. u bolesnika iz Slavanskog Kobaša, sela endemskog područja, pa se iz tog razloga bolest u lokalnog stanovništva naziva i "kobaška bolest". (3) Jedna od značajnih karakteristika EN je povezanost s nastankom karcinoma gornjih mokraćnih puteva, bubrežnih čašica, nakapnice i mokraćovoda. Bolest pogađa intersticij bubrega, točnije proksimalni tubul i posebno urotel gornjeg urotrakta. (4, 5) Prevalencija EN je u endemskim selima u razdoblju od 1975. do 1991. g. u prosjeku bila 4,4%, a u rasponu od 0,7% do 8,3%. (6-8) Novija straživanja iz 2005. g. na istom području, ali u smanjenom obimu, pokazala su smanjenje prosječne prevalencije na 2,3% za ciljano razdoblje (9, 10), na području od približno 10.500 stanovnika. (2)

Povezanost EN s karcinomom urotela gornjega urotrakta (engl. upper tract urothelial carcinoma, UUC), jedna je od karakteristika kod oboljelih od EN i to predominantno među ženama što je suprotno od pojavnosti u općoj populaciji izvan endemskog područja. Žene su prema nekim autorima češće oboljevale od muškaraca, a taj omjer se kretao od 2,04:1 do 3:2 u korist žena. (5) Pojedini autori ističu da je omjer oboljelih muškaraca i žena podjednak. (11)

U vremenu 50-tih godina 20. stoljeća oboljeli od EN umirali su u ranoj životnoj dobi s 40-50 godina od renalne insuficijencije. Zbog progresivnog kliničkog tijeka bolesti s bubrežnim zatajenjem i smrtnim ishodom ti bolesnici nisu oboljevali od UUC. Kasnija istraživanja pojavu UUC povezuju sa starijim dobnim skupinama 65-70 godina. (12-15) U razdoblju od 2003. do 2009. g. na razini RH zabilježen je broj od 298 slučajeva UUC od toga je u Brodsko-posavskoj županiji bilo 45 slučajeva, od kojih 9 slučajeva u endemskom području. Iz toga proizlazi da je srednja stopa morbiditeta od UUC na 100.000 stanovnika u RH iznosila 0,96; za Brodsko-posavsku županiju 3,63, a za endemski kraj 13,40. Specifični morbiditet od UUC-a u endemskom kraju iznosio je 13,90, odnosno za Brodsko-posavsku županiju 3,9 puta više nego za RH. (16) Opći mortalitet endemskog područja za period 1991.-2002. g. nije se značajnije razlikovao od općeg mortaliteta Brodsko-posavske županije i RH. (6) Međutim, specifični mortalitet od EN u istom razdoblju bio je 0,65. U periodu između 1995.-2002. g. specifični mortalitet endemskog područja u odnosu na područje RH za žene je bio znatno veći nego za muškarce i iznosio je 9,02 naspram 4,70. Specifični mortalitet od UUC-a za populaciju endemskog područja je bio 14 puta veći u odnosu na Brodsko-posavsku županiju i čak 55 puta veći u odnosu na RH. (6)

1.1.2. Etiologija endemske nefropatije

U proteklom razdoblju istraživana je utjecaj brojnih faktora okoliša na oboljevanje od EN, kao što su teški metali (olovo, živa, kadmij), zatim mikroelementi, brojni virusi i bakterije, policiklički ugljikovodici i aromatski spojevi. (17-19) Dugo vremena se tražila poveznica s okratoksinom A, mikotoksinom koji može izazvati kroničnu bubrežnu insuficijenciju u životinja kao i karcinom bubrega. (20, 21) Kod čovjeka se nije našla poveznica između pojačane ingestije okratoksina A i bubrežne insuficijencije ili bilo kojeg tipa tumora mokraćnih putova. (22)

Novija istraživanja etiologije EN provedena na endemskom području RH navode da je aristolohična kiselina, produkt biljke "vučja stopa", *Aristolochia clematitis*, odgovorna za pojavu EN i karcinoma urotela gornjega urotakta. (23)

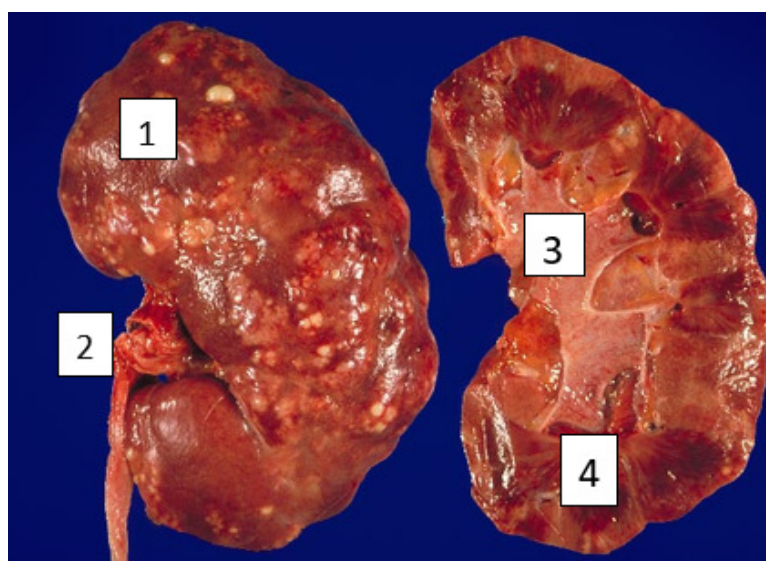
Godine 2012. Jelaković i sur. objavili su rezultate devetogodišnjeg istraživanja povezanosti EN i tumora urotela gornjega urotakta s aristolohičnom kiselinom, a ključna poveznica je bio pronalazak adukata aristolohične kiseline (AA) u karcinomima urotela kao i u tkivu bubrega nakon nefroureterektomije (NU). (23, 24) U prilog nalazu išla su istraživanja koja su još ranije ukazivala na povezanost ingestije sjemenki biljke *Aristolochiae clematitis* i pojave nefropatije. (25) Tu poveznicu se može usporediti sa nefropatijom kineskih trava kao i sa nefropatijom žena iz Belgije koje su uzimale pripravke za mršavljenje koji su sadržavali biljku *Aristolochia clematitis*. Razlika je u brzini nastanka kliničke slike odnosno u količini aristolohične kiseline koja se unosila u organizam. Tako su žene iz Belgije razvijale kliničku sliku bubrežne insuficijencije kroz par mjeseci do nekoliko godina u sklopu nefropatije aristolohične kiseline (AAN), a neke su oboljele i od karcinoma urotela gornjega urotakta. (26, 27) Za kliničku sliku EN koja je sporog tijeka i s UUC u kasnijoj fazi bolesti je odgovoran količinski mali unos fitotoksina vučje stope kroz dugi period od 15 godina. (28, 29, 30) Utvrđeno je da se specifična mutacija onkosupresora p53 nalazi u tkivu tumora UUC kao i u tkivu bubrežnog korteksa bolesnika s EN. Objašnjenje je u kovalentnom vezanju adukata AA i nastanku kovalentnih veza unutar dvostruke zavojnice DNA zbog čega se javlja greška pri transverziji A:T → T:A. (31, 32)

Istraživana je i genska predispozicija te nasljedni faktori odgovorni za pojavu EN čemu u prilog govori distribucija bolesti u populaciji pod rizikom i

manifestacija bolesti unutar obitelji najvjerojatnije kao rezultat poligenske predispozicije. Novija istraživanja genske predispozicije govore da je EN multifaktorska bolest s predispozicijom za rizične faktore okoliša. Istraživanja genske podloge za nastanak EN ukazala su na povezanost s genima na kromosomu 3 (3q25-3q26), tumor-supresor genima i protoonkogenima, mutacije gena HSPG2, KCNK5 i CELA1 na kromosomima 1, 6 i 12, nove spoznaje vezane za kromosom 6 i KCNK5 povezane s angiogenezom i EN te mutacije u sustavu mismatch repair. (33, 34)

1.1.3. Klinička slika endemske nefropatije

Poznato je da je EN bolest neuočljivog početka, asimptomatska, progresivnog, ali relativno sporog tijeka. Bolesnici mogu osjećati u početku opću slabost, brzo se umaraju, povremeno osjećaju lumbalnu bol. Karakteristična je tubularna proteinurija proteina niske molekulske mase u ranim fazama bolesti, kasnije je mješovita tubularno-glomerularna proteinurija (α_1 -mikroglobulin, β_2 -mikroglobulin, Tamm-Horsfall protein). Periferni edemi i povišeni krvni tlak javlja se u kasnijim fazama bolesti kako bolest progredira padom glomerularne filtracije, padom koncentracijske sposobnosti bubrega i na kraju do terminalne uremije i potrebe za hemodijalizom. Pojava UUC je klinička značajka EN. Normocitna hipokromna anemija je gotovo uvijek prisutna u bolesnika u ranim fazama bolesti i progredira s renalnom insuficijencijom. Morfološki, u EN bubreg može biti od urednog izgleda do vrlo malog skvrčenog i atrofičnog izgleda (slika 2). (35)



Kazalo: 1-kora bubrega; 2-nakapnica i mokraćovod; 3-čašice; 4-srž bubrega

Slika 2. Morfološki izgled bubrega u bolesnika s endemskom nefropatijom

1.1.4. Dijagnostički kriteriji endemske nefropatije

Dijagnostički kriteriji EN usaglašavali su se tijekom dugog niza godina i kako nisu bili ujednačeni za pojedina endemska područja, nije bilo lako uspoređivati kliničke podatke oboljelih. Godine 2013. g. Jelaković i sur. donijeli su preporuke sa svrhom izjednačavanja kriterija probira, dijagnoze i liječenja EN u svim endemskim žarištima na temelju ekspertnog mišljenja radne skupine stručnjaka iz različitih područja medicine (javno zdravstvo, nefrologija, urologija, epidemiologija, radiologija, patologija, onkologija, bazične znanosti).

Zaključci radne skupine se baziraju na šest glavnih točaka:

1. Važnost ranog probira EN i otkrivanja bolesti koji nije opravdan do 20. godine života kako kod sporadičnih slučajeva EN izvan endemskog područja, tako i za članove obitelji koji su odselili iz endemskog područja.
2. Određivanje i interpretacija razine glomerularne filtracije i albuminurije u EN u odnosu na druge kronične bubrežne bolesti prema preporukama: "The Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)" iz 2012. godine.
3. Alfa-1-mikroglobulinurija je pouzdani čimbenik oštećenja proksimalnog tubula. U slučaju albuminurije, omjer α 1-mikroglobulinurije i albuminurije će govoriti u prilog mjesta dominantne lezije.
4. Kriterij za probir u endemskim selima su: stanovnici u endemskim selima i/ili domaćinstvima s EN/UUC s boravkom dužim od 20 godina, oštećenje proksimalnog tubula, smanjena brzina glomerularne filtracije i UUC.
5. Sporadični slučajevi EN su: bolesnici kod kojih se ne može na drugačiji način objasniti renalna insuficijencija ili bolesnici s UUC koji žive u selima gdje se bave poljoprivredom, a izvan su endemskog područja. Zatim članovi obitelji oboljelih kao "sporadični slučaj EN", EN bolesnici na dijalizi gdje se inače ne dijaliziraju oboljeli od EN, transplantirani EN bolesnici koji žive u ne-endemskom području.
6. Elementi za utvrđivanje dijagnoze EN:
 - a) dokaz da je oštećenje proksimalnog tubula dominantna značajka
 - b) anemija primjerena dobi i spolu, drugi uzroci anemije isključeni
 - c) sve druge bubrežne bolesti isključene

d) biopsiju bubrega savjetovati bolesnicima u slučaju preklapanja s drugim kroničnim bubrežnim bolestima i u sumnjivim slučajevima na "sporadičnu EN"

e) isključiti sve druge nefrotoksične agense okoliša osim aristolohičnu kiselinu

Pored zaključaka sažetih u šest glavnih točaka, radna skupina je dala i preporuke za provjeravanje i nadgledanje, dijagnostičke metode za EN i UUC, liječenje i prevenciju i preporuke za transplantaciju oboljelih od EN (tablica 1, tablica 2). (36)

Tablica 1. Smjernice za probir, nadzor, dijagnostiku, prevenciju i liječenje bolesnika s endemskom nefropatijom (EN) i karcinomom urotela gornjega urotrakta (UUC) i bolesnika s transplantiranim bubregom

Preporuke A: Probir i nadzor
1A. Odrasle stanovnike EN sela trebalo bi pregledati. Bolesnike treba uputiti nefrologu.
2A. Sumnjivi za bolest i članovi EN domaćinstava bez znakova oštećenja proksimalnog tubula ili UUC trebaju se kontrolirati jednom godišnje.
3A. Postupak masovnog probira trebao bi se ponoviti u EN selima nakon pet godina.
4A. Treba utvrditi tubularnu proteinuriju, eGFR, broj eritrocita i citologiju urina.
5A. Bubrežnu funkciju treba provjeriti u svih UUC bolesnika iz poljoprivrednih sela. Bubrežni korteks bioptiran tijekom operacije (udaljen od tumora) treba analizirati na postojanje EN i ako je moguće, treba ga zamrznuti na -20°C radi naknadnog određivanja razine adukata AA-DNA. Mutacijski spektar p53 odrediti u tumorskom tkivu.
6A. Bolesnike s terminalnim stadijem bubrežne bolesti (ESRD), nepoznatog podrijetla iz ne-EN sela i članove takvih domaćinstava trebalo bi pregledati kako bi se utvrdili slučajevi sporadičnog EN/UUC.
Preporuke B-1: Dijagnostičke metode za EN
1B. Analizirati samo odgovarajući prikupljene uzorke urina.
2B. Granična vrijednost za veličinu glomerularne filtracije i albuminurije (UAE) i

α -1MCR su 10 mg/L, odnosno 23,5 mg/g. Za procjenu bolesnika s albuminurijom treba koristiti α -IM/ UAE, granična vrijednost je $\geq 0,91$. Za potvrdu dijagnoze i za praćenje treba koristiti α -1MCR, granična vrijednost je 31,5 mg/g.

3B. 24-h izlučivanje proteina treba mjeriti u osoba sa: smanjenim eGFR-om; s albuminurijom i α 1M / UAE $< 0,91$.

4B. GFR treba procijeniti pomoću jednadžbe CKD-EPI iz 2009. godine.

5B. Bolesnike s EN-om treba razvrstati prema smjernici KDIGO iz 2012. godine.

6B. Anemija je definirana kao razina hemoglobina < 120 g/L za muškarce i žene > 50 godina i < 110 g/L za žene ≤ 50 godina.

7B. Biopsiju bubrega treba razmotriti kod osoba s: proteinurijom ≥ 1 g/dU; sa sumnjom na drugu postojeću bolest bubrega.

8B. Bolesnike s EN u fazama CKD-a $\geq 3A$ i bolesnike s histopatološkim nalazima povezanim s kroničnom nefropatijom aristolohične kiseline treba nadzirati zbog UUC-a.

Preporuke B-2: Dijagnostičke metode za UUC

9B. Ispitanici visokog rizika za razvoj UUC-a (bolesnici s: histopatološkim nalazima koji ukazuju na EN; bolesnici s EN-om i CKD-a $\geq 3A$ stadija ili na dijalizi) trebaju kontrolu citologije urina, ultrazvuka ili drugih slikovnih tehnika svakih 6 mjeseci.

10B. Članove EN domaćinstava trebalo bi pregledavati svake godine.

11B. Bolesnike s prethodnim UUC-om, rakom mokraćnog mjehura ili hematurijom treba pregledavati svaka tri mjeseca. Hematuriju treba procijeniti cistoskopijom.

12B. Raspoložive dijagnostičke postupke kao (kontrastni CT i ureteropijeloskopija) trebaju se koristiti za vizualizaciju UUC-a. (37)

13B. Kod EN transplantiranih bolesnika i u EN bolesnika koji su podvrgnuti dijalizi, cistoskopija se mora provoditi svakih 6 mjeseci.

Preporuke C: Prevencija i liječenje

1C. Stanovnike sela treba obavijestiti da: (a) EN ima podmukli početak, ali uvijek

napreduje do ESRD-a i da rana dijagnoza omogućava provedbu liječenja što može usporiti napredovanje kronične bubrežne bolesti KBB; (b) EN i UUC nisu nasljedne bolesti, također bi trebali znati da je genetska predispozicija vjerojatna, ali relevantna tek nakon dugotrajne izloženosti nefrotoksinima u okolišu.

2C. Stanovnike sela treba snažno ohrabriti da sudjeluju u programima probira i posjećuju nefrologe.

3C. Tijela javnog zdravstva trebaju educirati izloženu populaciju i treba naglasiti ulogu AA u EN-u.

4C. Javno-zdravstvena i poljoprivredna tijela trebala bi pokrenuti napore za uklanjanje aristolohije s polja na kojima se uzgaja žito.

5C. Obiteljski liječnici opće medicine trebaju informirati pacijente o važnosti primarne i sekundarne prevencije kronične bubrežne bolesti počevši od važnosti promjena životnog stila te o velikom riziku od razvoja UUC-a i potrebi redovitog praćenja.

6C. Pacijente s potvrđenom EN treba liječiti poput ostalih bolesnika s KBB-om i ESRD-om, peritonealnom dijalizom, hemodijalizom ili transplantacijom bubrega.

Preporuke C: Liječenje bolesnika s UUC

10C. Standardna terapija je potpuna NU s ekscizijom manžete mokraćnog mjehura oko mokraćnog ušća i regionalne limfadenektomije. Tome u prilog ide i opažanje da su ponavljajući tumori kod EN bolesnika viđeni češće nego kod ostalih bolesnika s UUC-om.

11C. Konzervativni kirurški pristup trebao bi biti rezerviran samo za odabrane bolesnike s bilateralnim tumorima kod kojih je očuvanje bubrega važno. Pacijenti liječeni konzervativnim pristupom izloženi su povećanom riziku lokalnog recidiva i zahtijevaju česte kontrole.

12C. Sve bolesnike s UUC-om treba pažljivo nadzirati zbog ponavljajućih ili novih tumora.

13C. Kemoterapija je indicirana za lokalno proširenu i metastatsku bolest kada nije moguće izvesti operativni zahvat. (37)

Preporuke C: Transplantacija bubrega u bolesnika s EN

15C. Bolesnike s EN-om treba uvrstiti na listu za transplantaciju bubrega, zajedno s ostalim bolesnicima s ESRD-om, ali je potrebno u takvih bolesnika isključiti prisutnost karcinoma urotela.

16C. Kod transplantacije sa živih darivatelja nužno je obaviti dodatna ispitivanja. Ako je darivatelj živio u EN području više od 15 godina, potrebno je učiniti biopsiju bubrega kako bi mogli isključiti EN i/ili prisutnost adukata AA-DNA. Pronalaženje bilo kojeg od navedenih isključuje potencijalnog darivatelja.

17C. Obzirom na visoku učestalost UUC-a kod EN/AAN transplantiranih bolesnika, svi bolesnici s EN-om trebaju se podvrgnuti obostranoj NU prije transplantacije. Obostranu NU treba učiniti kod svih primatelja EN mlađih od 65 godina. Kod EN bolesnika starijih od 65 godina, obostranu NU trebalo bi učiniti prije transplantacije bubrega ako je: (a) već dijagnosticiran UUC ili karcinom mokraćnog mjehura; (b) pozitivna obiteljska anamneza za UUC ili EN.

18C. Nakon transplantacije, EN bolesnike koji su odbili obostranu NU treba pažljivo nadzirati zbog UUC.

19C. Imunosupresiju mTOR inhibitorima treba razmotriti za EN transplantirane bolesnike.

Kazalo: EN-endemska nefropatija; UUC-karcinom urotela gornjeg urotrakta; eGRF-procjena brzine glomerularne filtracije; AA-aristolohična kiselina; DNA dezoksiribonukleinska kiselina; p53-tumor supresor gen; ESRD (engl. End-stage Renal Disease) terminalni stadij bubrežne bolesti; mokraćni α 1-mikroglobulin/albumin (A1M/UAE); CKD (engl. Chronic Kidney Disease); KBB (kronična bubrežna bolest); AAN-nefropatija aristolohične kiseline; mTOR-(eng. mechanistic target of rapamycin); meh. meta rapamicina

Tablica 2. Klasifikacija populacije s obzirom na endemsku nefropatiju (EN)

I Oboljeli/bolesni od EN	II Sumnjivi da boluju od EN
<ol style="list-style-type: none"> 1. Bolest dokazana biopsijom (indikativna za EN)¹ ili 2. Boravak u EN selima >20g + tubularna proteinurija² + smanjena glomerularna filtracija + anemija³ ili 3. Boravak u EN kućanstvima >15g + tubularna proteinurija² ili 4. Boravak u EN selima >20g + UUC³ + tubularna proteinurija² 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Boravak u EN kućanstvima > 15g + smanjena glomerularna filtracija + anemija³ ili 2. Boravak u EN selima >20g + tubularna proteinurija² ili 3. Boravak u EN selima >20g + UUC³
III Visokorizična skupina za EN	IV Sporadična EN ⁴
<ol style="list-style-type: none"> 1. Boravak u EN kućanstvima > 15 godina 2. Boravak u kućanstvima sa sporadičnim EN slučajevima > 15 godina 	<p>Dokazano biopsijom/indikativno za EN u bolesnika s UUC iz neendemskih područja ili u osoba iz njihovog kućanstva</p>

Kazalo: EN-endemska nefropatija;UUC-karcinom urotela gornjega urotrakta;¹Ne postoje značajke koje su patognomonične za EN, ali otkrivanje adukata AA-DNA i mutacija p53 su dijagnostičke; Omjer mokraćnog α 1-mikroglobulina i kreatinina (A1M/MCR) > 31,5 mg/g i omjer mokraćnog α 1-mikroglobulina i albumina (A1M/UAE) \geq 0,91; ²A1M/MCR >31,5 mg/g i A1M/UAC \geq 0,91; ³Hemoglobin <120 g/L za muškarce i žene >50 godina, <110 g/L za žene \geq 50 godina; ⁴Ispitanici s kroničnom intersticijskom nefropatijom kod kojih bi se trebali isključiti drugi uzroci (refluksna nefropatija, kronični pijelonefritis, rekurentni pijelonefritis, hipertenzivna nefroskleroza, izloženost olovu, kadmiju, biljkama koje sadrže AA, ciklosporin A)

1.1.5. Liječenje endemske nefropatije

Za bolesnike koji boluju od EN nema specifične terapije, već se bolesnicima koji su u različitim stadijima bubrežne insuficijencije nastoji produžiti vrijeme do terminalnog stadija bubrežne insuficijencije što za takve bolesnike znači nastavak liječenja hemodijalizom ili transplantacijom bubrega.

1.2. KARCINOMI UROTELA GORNJEGA UROTRAKTA (UUC)

1.2.1. Etiologija karcinoma urotela gornjega urotakta

Karcinomi urotela su četvrti po učestalosti zloćudnih tumora u čovjeka. Javlja se kao karcinom urotela mokraćnog mjehura i mokraćne cijevi odnosno karcinom urotela donjega urotakta i kao karcinom bubrežnih čašica, nakapnice i mokraćovoda odnosno karcinom urotela gornjega urotakta.

Karcinom mokraćnog mjehura u 90-95% slučajeva spada u najčešće sijelo karcinoma urotela. Skupini karcinoma UUC pripada približno 5% zloćudnih tumora urotela s incidencijom od 1,8 novih slučajeva na 100000 stanovika godišnje u zapadnim zemaljama. Incidencija među muškarcima je značajno viša (2,7/100000) naspram žena (1,1/100000). (38) Više od polovice UUC-a u trenutku postavljanja dijagnoze su invazivni T2 ili višeg stadija od kojih je jedna četvrtina s regionalnim metastazama, a svega je 20% karcinoma mokraćnog mjehura u vrijeme postavljanja dijagnoze invazivno. U većine bolesnika s UUC-om je zahvaćen jedan ureter, a samo u 2-4% slučajeva su zahvaćena oba. (39)

Prosječna životna dob kada se javlja UUC je 65-80 godina života i češće kod muškaraca, nego kod žena. (40)

Lynch sindrom ili nasljedni nepolipozni oblik karcinoma kolona je poremećaj u sklopu kojeg je povećan rizik za nastanak više vrsta karcinoma među kojima su i karcinomi urotela. Nasljednost u pojavi UUC vezano uz Lynch sindrom odnosi se na mutacije (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) u mismatch repair genu (gen MMR). (41,42)

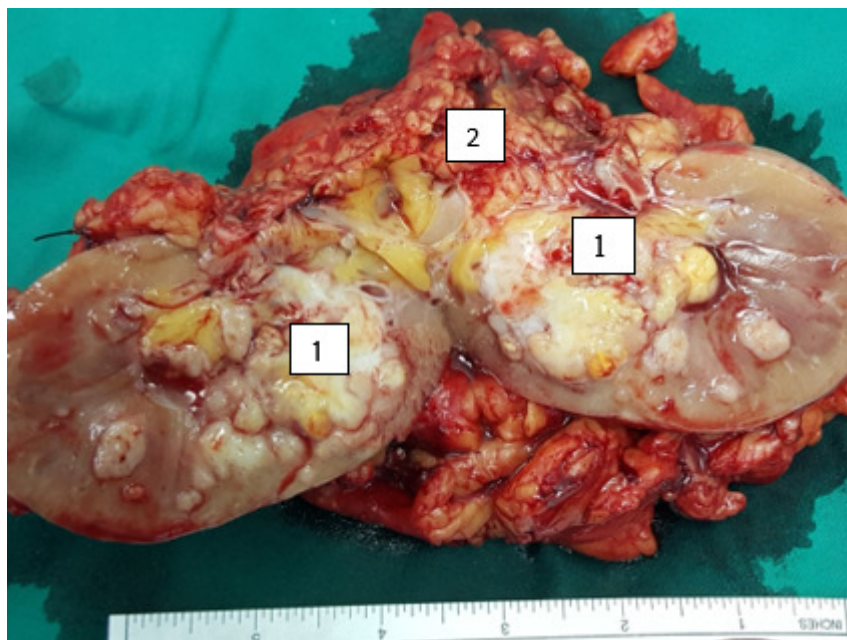
Neki faktori okoliša djeluju na povećanu incidenciju karcinoma urotela. Poznato je da izloženost duhanu povećava rizik za nastanak karcinoma mokraćnog mjehura i to za 2-7x. Djelovanje adukta aristolohične kiseline iz biljke vučja stopa povezana je specifičnom mutacijom gen supresora p53 na poziciji 139 u kodonu, a koja se javlja uglavnom u bolesnika s nefropatijom kineskih trava ili

endemskom nefropatijom s UUC. Postoji i velika učestalost UUC-a u endemskom području na Tajvanu koja se ne može direktno i sa sigurnošću povezati s povećanom količinom arsena u pitkoj vodi. (43, 44)

1.2.2. Histološki oblici karcinoma urotela gornjega urotrakta

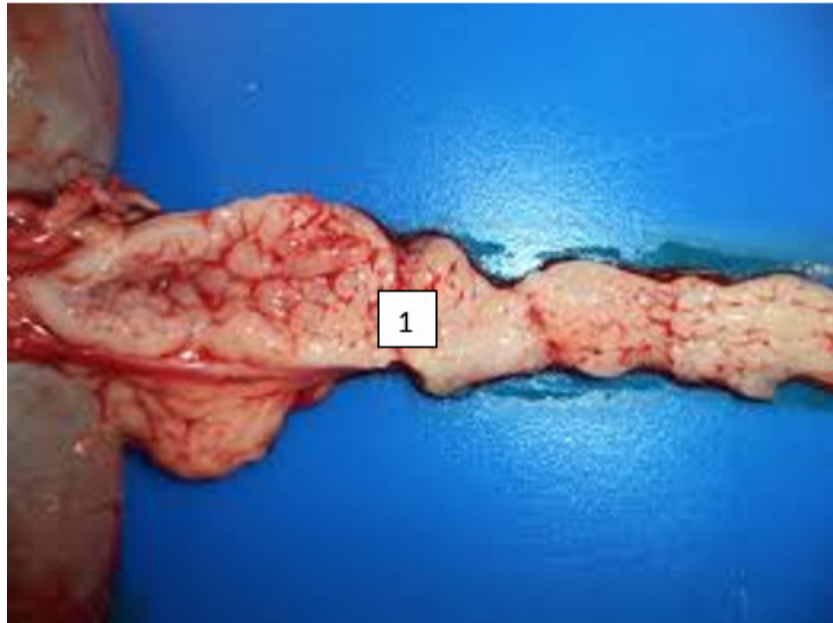
U najvećem broju slučajeva UUC su čisti karcinomi prijelaznog urotela, a u manjem postotku mogu imati sarkomatoidnu, limfoepitelnu komponentu. Skvamocelularni karcinom se najčešće spominje uz kroničnu upalu i litijazu. (45,46)

Belinijev karcinom ili karcinom sabirnih kanalića može imati slične karakteristike kao UUC radi bliskog embrionalnog porijekla ali ta vrsta tumora ipak spada u karcinom bubrežnih stanica. (47)



Kazalo:1-bubrežne čašice; 2-bubrežna nakapnica

Slika 3. Izgled karcinoma bubrežnih čašica i nakapnice



Kazalo:1-otvoreni lumen mokraćovoda ispunjen karcinomom

Slika 4. Izgled karcinoma mokraćovoda

1.2.3. Stupnjevanje i klasifikacija karcinoma urotela gornjega urotrakta

Razlikujemo neinvazivne papilarne karcinome niskog malignog potencijala, urotelne karcinome male i velike malignosti, maligne promjene koje su u razini sluznice (carcinoma in situ, CIS) i invazivne urotelne karcinome. Makroskopski izgled tumora bubrežnih čašica, nakapnice i mokraćovoda prikazani su na slikama 3 i 4. (48)

Urotelni karcinomi se klasificiraju prema proširenosti tumora, statusu limfnih čvorova i prisutnosti metastaza (TNM) klasifikaciji. Posljednja klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organizaton, WHO) iz 2016. godine prikazana je u tablici 3. (49, 50).

Tablica 3. Klasifikacija proširenosti tumora karcinoma urotela gornjega urotrakta

T - primarni tumor
Tx - primarni tumor se ne može procijeniti
T0 - bez podataka o primarnom tumoru
Ta - neinvazivni papilarni karcinom
Tis - karcinom "in situ"
T1 - Tumor prodire u subepitelno vezivno tkivo
T2 - Tumor prodire u mišićni sloj
T3 - Tumor prodire izvan mišićnog sloja u masno tkivo bubrežne nakapnice i/ili tkivo bubrega; tumor uretera prodire izvan mišićnog sloja u periuretralno masno tkivo
T4 - Tumor zahvaća druge organe ili kroz tkivo bubrega prodire u okolno masno tkivo
N - regionalni limfni čvorovi
Nx - Regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
N0 - Bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
N1 - Metastaza u jedan limfni čvor koji je u najvećem promjeru <2 cm
N2 - Metastaza u jedan limfni čvor >2 cm u promjeru ili u više limfnih čvorova
M - udaljene metastaze
M0 - Bez udaljenih metastaza
M1 - Udaljene metastaze

Kazalo: TNM (engl. Tumor, Nodus, Metastasis)

1.2.4. Dijagnoza karcinoma urotela gornjega urotakta

1.2.4.1. Simptomi karcinoma urotela gornjega urotakta

Najčešći simptom u oko 80% oboljelih je krv u mokraći vidljiva okom ili ona mikroskopska, bol u lumbalnoj loži, gubitak na tjelesnoj težini, povišena tjelesna temperatura, opća slabost. (51)

1.2.4.2. Dijagnostičke metode za otkrivanje karcinoma urotela gornjega urotakta

Višeslojna kompjuterizirana urografija (MSCT urografija) ima najveću dijagnostičku vrijednost radi velike specifičnosti pretrage od 0,93-0,99 i senzitivnosti 0,67-1,0. (52) Pored tumora može se vidjeti posljedična dilatacija šupljinskog sustava bubrega tumorom, prodor tumora u stijenu organa i okolne strukture kao i povećanje limfnih čvorova i metastaze u udaljene organe što u konačnici ima lošiju prognozu u smislu liječenja i preživljenja kod metastatske bolesti.

Urografija pomoću magnetske rezonance (MR urografija), indicirana je za bolesnike kod kojih se ne može napraviti MSCT urografija. Najčešći razlog za to je alergija na jedno kontrastno sredstvo ili smanjena bubrežna funkcija kod koje bi primjena vodotopivog jodkontrastnog sredstva mogla pogoršati već oštećenu bubrežnu funkciju. Osjetljivost MR urografije je 0,75 i manja je u usporedbi s MSCT urografijom posebno za tumore manje od 2 cm. (53) Treba napomenuti da se MR urografija može koristiti u slučajevima kod kojih bolesnici imaju oštećenu bubrežnu funkciju, smanjenu glomerularnu filtraciju i klirens kreatinina, jer se kao kontrastno sredstvo koje bitno manje oštećuje bubrežnu funkciju upotrebljava gadolinij. Citološki nalaz urina, uretrocistoskopija i ureterorenoskopija su naredne pretrage u dijagnostici UUC.

Pozitivan nalaz citologije urina kod uredne uretroskopije i cistoskopije sugerira na UUC. Citologija je manje osjetljiva metoda za UUC posebno za karcinome manjeg stupnja zloćudnosti stoga bi bilo poželjnije uzimati uzorke urina iz bubrežne nakapnice i mokraćovoda lijeve i desne strane. Retrogradna ureteropijelografija je način kontrastne pretrage gornjeg urotakta kod koje se kontrastno sredstvo ne ubrizgava u sistemsku cirkulaciju nego u šupljinski sustav bubrega i opcija je za dijagnostiku UUC. Ureterorenoskopija je metoda direktne vizualizacije

unutrašnjosti šupljinskog sustava gornjeg urotrakta. Fleksibilna ureterorenoskopija se primjenjuje za vizualiziranje unutrašnjosti mokraćovoda, bubrežnih čašica i bubrežne nakapnice i koristiti se za biopsiju sumnjivih promjena sluznice i tumorskih promjena gornjega urotela. (54)

1.2.5. Prognoza karcinoma urotela gornjega urotrakta

1.2.5.1. Preoperativni čimbenici

Prognostički faktor za UUC je proboj u mišićni sloj i iznosi manje od 50% petogodišnjeg preživljenja, odnosno manje od 10% za bolesnika s udaljenim metastazama u trenutku postavljanja dijagnoze. Starija dob bolesnika u vrijeme dijagnoze UUC povezuje se s smanjenim preživljenjem oboljelih od UUC-a. Isto tako mnogi stariji bolesnici su izliječeni od UUC-a te se dob neovisno ne može uzeti kao pouzdan pokazatelj ishoda. Isto tako i spol se više ne smatra neovisnim prognostičkim faktorom koji utječe na smrtnost od UUC-a. (55-57)

Populacijska istraživanja pokazala su da su bolesnici afroameričkog podrijetla imali lošiju prognozu od ostalih uspoređivanih skupina. (58) Uživanje duhanskih proizvoda povećava rizik za smrtnost i povratak bolesti nakon operativnog liječenja i povećava rizik za pojavu ili povratak bolesti u mokraćni mjehur. Bolesnici s ureteralnim i/ili multifokalnim tumorom imaju lošiju prognozu spram bolesnika s tumorom u pijelonu uspoređujući stupanj malignosti tumora. (59)

Kada se postavi dijagnoza UUC i indikacija za operativni zahvat, postupak bi se trebalo provesti unutar 5 tjedana jer svaka veća odgoda zahvata povećava rizik progresije bolesti. (60)

Limfovaskularna invazija kao i prisutnost tumorskih nekroza također se ubrajaju u loše prognostičke faktore. (61-67)

1.2.5.2. Postoperativni čimbenici

Nakon operativnog zahvata procjenjuje se stadij i stupanj malignosti bolesti. Metastaza u limfne čvorove je negativan prognostički čimbenik za preživljavanje bolesnika. Limfadenektomija tijekom radikalne nefroureterektomije (RNU) važna je u procjeni stadija bolesti. (68)

Limfovaskularna invazija se nalazi u oko 20% bolesnika s UUC pri RNU te predstavlja neovisni prognostički faktor i potrebno je navesti taj podatak u svakom patohistološkom nalazu. Pozitivan kirurški rub povećava vjerojatnost povratka bolesti. (69-71)

Molekularni markeri kao što su markeri stanične adhezije E-kaderin i CD24, receptor epidermalnog faktora rasta, stanične proliferacije Ki-67, apoptoze Bcl-2, angiogeneze, vaskularne invazije, RON, C-met pokazali su povezanost s UUC. Do sada su takva istraživanja rađena na malim serijama bolesnika i nisu još do sada ušla u kliničke dijagnostičke prognostičke kriterije. (72-78)

1.2.6. Liječenje karcinoma urotela gornjega urotrakta

1.2.6.1. Lokalizirana bolest

Poštedna operacija UUC može se provoditi kod karcinoma urotela niskog stupnja malignosti tako da se ne ugrozi klinički ishod za preživljenje bolesnika koji bi bio isti kao i kod radikalne nefroureterektomije bez obzira na status kontralateralnog bubrega.

Isti se može razmatrati i kod bolesnika s oštećenom funkcijom bubrega ili kod solitarnog bubrega. Endoskopskim pristupom odnosno ureteropijeloskopijom se mogu razmatrati operacije tumora niskog stupnja malignosti i to u slučajevima lareske ablacije fleksibilnim ureterorenoskopom premda u tom slučaju se ne može dobiti adekvatan patohistološki nalaz te ovdje postoji mogućnost neadekvatnog nalaza stadija bolesti i stupnja malignosti. (79)

Perkutani pristup se primjenjuje kod tumora niskog stupnja malignosti najčešće smještenog u donjim čašicama bubrega gdje se ne može adekvatno pristupiti fleksibilnim ureterorenoskopom. U tom postupku moguć je rasap malignih stanica kroz operativno polje.

Segmentalna resekcija mokraćovoda, selektivna ureterektomija (SU) s kirurškim rubom bez tumora, kod tumora niskog stupnja malignosti je način očuvanja istostranog bubrega s tim da se kod tog postupka može učiniti i adekvatna limfadenektomija. Kod tumora distalnog mokraćovoda niskog stupnja malignosti se može učiniti resekcija s dijelom mokraćnog mjehura te se može učiniti nova anastomoza mokraćovoda s mokraćnim mjehurom. Takva operacija se

može učiniti i kod tumora s visokom stupnjem malignosti kod pošteđenih operacija u bubrežnoj insuficijenciji ili kod solitarnog bubrega.

Radikalna nefroureterektomija je otvoreni operativni zahvat pri kojem se odstrani bubreg, mokraćovod i dio mokraćnog mjehura kroz koji prolazi mokraćovod i predstavlja standard pri otklanjanju UUC. Kako bi se izbjegla diseminacija tumora potrebno je izbjegavati otvaranje mokraćnog puta, direktan dodir instrumenata i tumora, odstranjenje bubrega i mokraćovoda s dijelom mokraćnog mjehura u bloku. Invazivni i veliki tumori s metastazama u limfnim čvorovima i lokalno uznapredovale tumore se ne operira laparoskopski. Dosadašnje studije nisu pokazale značajnu razliku između općeg preživljenja i karcinom specifičnog preživljenja obzirom na odabir RN otvorenim nasuprot laparoskopskom pristupu. (80-82)

1.2.6.2. Proširena bolest

Kod proširene bolesti RNU samostalno nema značaja u smislu općeg preživljenja bolesnika i karcinom specifičnog preživljenja bez primjene sistavne kemoterapije i izvodi se samo u slučaju potrebe palijativnog liječenja. Sustavna kemoterapija standardni je pristup za bolesnike s neoperabilnim lokalno uznapredovalim ili metastatskim UUC na bazi cis-platine i gemcitabina. U slučaju lokalno proširene bolesti postoje studije koje pokazuju korist neoadjuvantne i adjuvantne kemoterapije u kombinaciji s RNU za opće preživljenje i karcinom specifično preživljenje. Kemoterapija se primjenjuje u slučajevima kada je to moguće obzirom na opće stanje bolesnika i uz očuvanu bubrežnu funkciju. (83-88)

Adjuvantna instilacija kemoterapeutika u mokraćni mjehur kao što su mitomicin c, doksorubicin, gemcitabin koja se učini u manje od 72 sata nakon RNU smanjuje stopu pojave tumora u mokraćnom mjehuru u prvoj godini nakon RNU. Stopa pojavnosti tumora u mokraćnom mjehuru nakon RNU je između 22 i 47%. (89, 90)

1.3. GLAVNI SUSTAV TKIVNE PODUDARNOSTI

Glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC) predstavlja veliku skupinu od 200 i više do sada otkrivenih gena, koji se dijele na gene MHC-razreda I, MHC-razreda II i MHC-razreda III. Geni ovog sustava igraju ključnu ulogu u imunosti, tj. imunološkoj reakciji.

U čovjeka se MHC naziva sustav HLA (engl. Human Leukocyte Antigen, HLA), po tome što je prvoopisani lokus HLA-A uočen na površini ljudskih leukocita još davne 1958.godine. Danas genski kompleks HLA predstavlja najsloženije opisani sustav gena kod čovjeka, premda na njegovu sekvencu otpada svega 0,001% cijelog humanog genoma. Geni HLA kodiraju molekule HLA odgovorne za imunološku reakciju koja nastaje pri prepoznavanju stranih antigena i to od patogenih uzročnika raznih bolesti, u transplantaciji tkiva i organa, preko čimbenika koji nastaju u pojedinim autoimunim bolestima do povezanosti s karcinogenezom. (91)

Općepoznato je da su geni HLA najpolimorfniji geni u ljudskom genomu s velikim brojem alela na svakom pojedinom lokusu HLA. (92) Raznolikost alela, odnosno njihovih kombinacija održavaju se se na razini populacije zbog individualne sličnosti, odnosno razlike u imunološkom odgovoru na strane antigene. Ključna uloga molekula sustava HLA je održavanje ravnoteže ekspresije antigena na staničnoj razini mehanizmima prepoznavanja antigena. (93)

1.3.1. Smještaj i organizacija regije sustava HLA

Regija HLA smještena je na kraćem kraku kromosoma 6, na poziciji 6p21.1-21.3 i obuhvaća više od 4 milijuna parova baza. Ako gledamo kraći krak kromosoma 6 (slika 5), tada je najbliže centromeri smještena skupina gena HLA razreda II, najudaljenija od centromere je skupina gena HLA razreda I, smještena telomerno, a između te dvije skupine gena HLA smjestili su se geni HLA razreda III. Položaj lokusa HLA utvrđena je mapiranjem gena odnosno analizom učestalosti rekombinacija (engl. crossing-over) u sekvenci susjednih lokusa i hibridizacijom DNA. Genska regija HLA razreda I obuhvaća klasične i neklasične gene HLA. U klasične se ubrajaju geni HLA -A, -B i -C, čije su molekule prisutne na gotovo svim stanicama našeg organizma. Neklasični geni HLA razreda I mogu

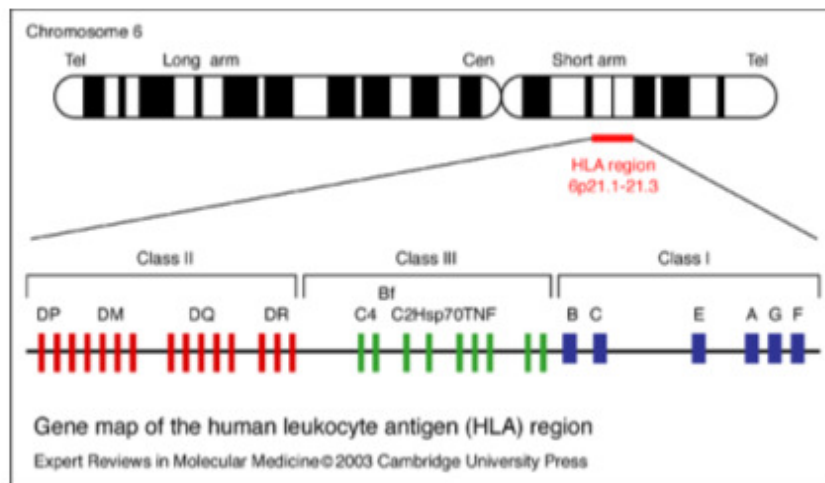
se podijeliti u dvije podgrupe, prva podgrupa su geni HLA-E, -F i -G koji kodiraju molekule unutar HLA razreda I, koji se od klasičnih gena HLA razreda I razlikuju po manjem polimorfizmu, drugačijoj tkivnoj raspodjeli, funkciji, kao i učinku njihovih produkata te podgrupa gena koja obuhvaća djelove gena (npr. HLA-H, -I, -J).

Genska regija HLA razreda II sastoji se od 6 genskih podregija: HLA-DM, -DN, -DO, -DP, -DQ i -DR. Klasične podregije HLA razreda II HLA-DP, -DQ i -DR obuhvaćaju gene koji kodiraju molekule na membranama specijaliziranih antigen predočnih stanica (B-limfocita, makrofaga, dendritičkih stanica, specijaliziranih epitelnih stanica) i vezna su mjesta za CD4⁺ limfocite. Geni neklasičnih podregija HLA razreda II (HLA-DM, -DN i -DO), kodiraju molekule koje se nalaze u citoplazmi na unutarstaničnim membranama kao što su lizosomi, obično noseći antigene peptide, odnosno antigen predočne molekule HLA razreda II. (94, 95)

U sklopu regije HLA razreda II nalaze se geni koji su odgovorni za ustroj molekula HLA razreda I poput TAP1 i TAP2 (engl. Transporters Associated with antigen Processing).

Genska regija HLA razreda III obuhvaća gene koji ne spadaju u tzv. klasične gene HLA, već kodiraju molekule koje nisu neposredno uključene u proces imunološkog prepoznavanja, a sudjeluju u imunološkim reakcijama. Tu se ubrajaju pojedine komponente komplementa (C2, C4A, C4B), zatim citokini (engl. Tumor Necrosis Factors, TNF, TNF- α , TNF- β); LT- α , LT- β (engl. Lymphotoxin), proteini toplinskog šoka (engl. Heat Shock Proteins, HSP), kao i druge molekule koje nemaju ulogu u imunološkim reakcijama. (96, 97)

ORGANISATION OF HLA REGION



Slika 5. Shematski prikaz organizacije i rasporeda gena HLA na kraćem kraku kromosoma 6

1.3.2. Obilježja sustava HLA

Glavna obilježja sustava HLA su polimorfizam i poligenost s više od 200 opisanih gena i preko 25 000 različitih alela, čiji se broj neprekidno povećava pronalaženjem novih tehnika identifikacije. (98)

Među najpolimorfnije lokuse HLA spadaju lokusi HLA-B i HLA-DRB1 (slika 5).

Polimorfizam gena HLA je rezultat rekombinacije unutar pojedinog gena, što predstavlja izmjenu različitih alela istog lokusa HLA, zatim konverzijom gena tj. izmjenom ulomaka između različitih gena, mutacijama među kojima je najčešća točkasta u vidu insercije ili delecije baze ili baznog para u lancu nukleotida te evolucijskom selekcijom. (99)

Učestalost mutacija u regiji HLA manja je nego što bi se očekivalo naspram količine mutacija u ostatku humanog genoma, stoga je izrazita polimorfnost gena HLA uvelike posljedica evolucijske selekcije. Iz toga proizlazi i da je heterozigotnost HLA 80-90% naspram homozigotnosti, selekcijska prednost jedinki.

Još jedna odlika sustava HLA je i kodominantnost alela, a označava podjednaku nazočnost oba alela, odnosno haplotipa HLA nasljeđena od roditelja,

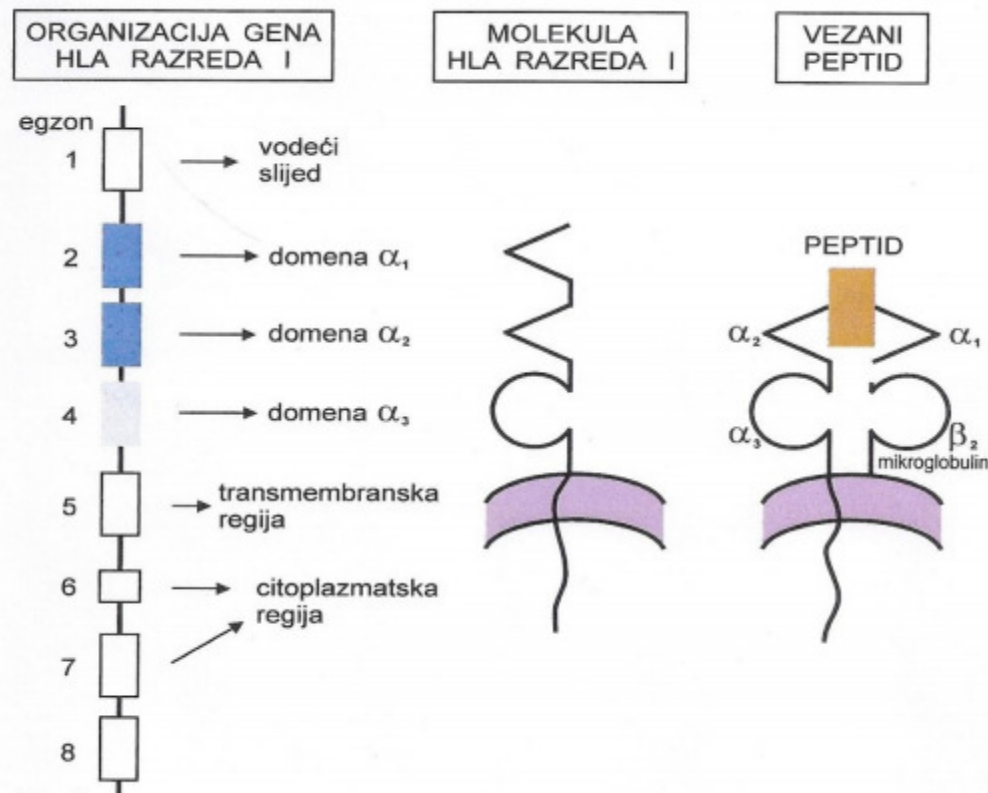
na površini stanice. Određena kombinacija alela različitih lokusa HLA na jednom kraku kromosoma 6 čini haplotip, a unutar regije HLA učestalost rekombinacije iznosi <2%. (100)

Haplotipovi HLA roditelja (jedan od oca i jedan od majke), udruženi u par čini genotip HLA. Specifičnost po kojoj je sustav HLA također poznat je pojava neravnoteže udruživanja (engl. linkage disequilibrium, LD) tj. da se aleli bliskih lokusa HLA pojavljuju u zajedničkom haplotipu učestalije od očekivanog, u odnosu na njihovu pojedinačnu učestalost.

1.3.3. Geni i molekule HLA razreda I

Svaki gen HLA građen je od egzona i introna. Gen za teški lanac molekula HLA razreda I sadrži 8 egzona (kodirajuće sekvence), a razdvojeni su različito dugim intronima (nekodirajućim sekvencama). Egzoni 2 i 3 kodiraju najpolimorfiji dio molekule HLA razreda I koje čini vezno mjesto za strani antigen. (101)

Molekule HLA razreda I građene od dva polipeptidna lanca u naravi su heterodimerni membranski glikoproteini. Teški lanac (α) građen je od oko 350 aminokiselina (~45 kD), i sastoji se od tri dijela (ekstracelularni, transmembranski i citoplazmatski). Ekstracelularni je građen od tri domene $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$. Domene $\alpha 1$ i $\alpha 2$ grade pukotinu koja predstavlja vezno mjesto za strani antigen, a domena $\alpha 3$ posjeduje vezno mjesto za stanični receptor citotoksičnog limfocita T i slična je konstantnom dijelu imunoglobulina. Polimorfizam molekula HLA razreda I u prvom redu posljedica je rasporeda aminokiselina u domenama $\alpha 1$ i $\alpha 2$. Laki lanac, $\beta 2$ mikroglobulin (12 kD), kodiran je genom smještenim na kromosomu 15. Funkcija lakog lanca je učvršćivanje molekule HLA razreda I i nema ulogu u prezentaciji stranih antigena (slika 6).



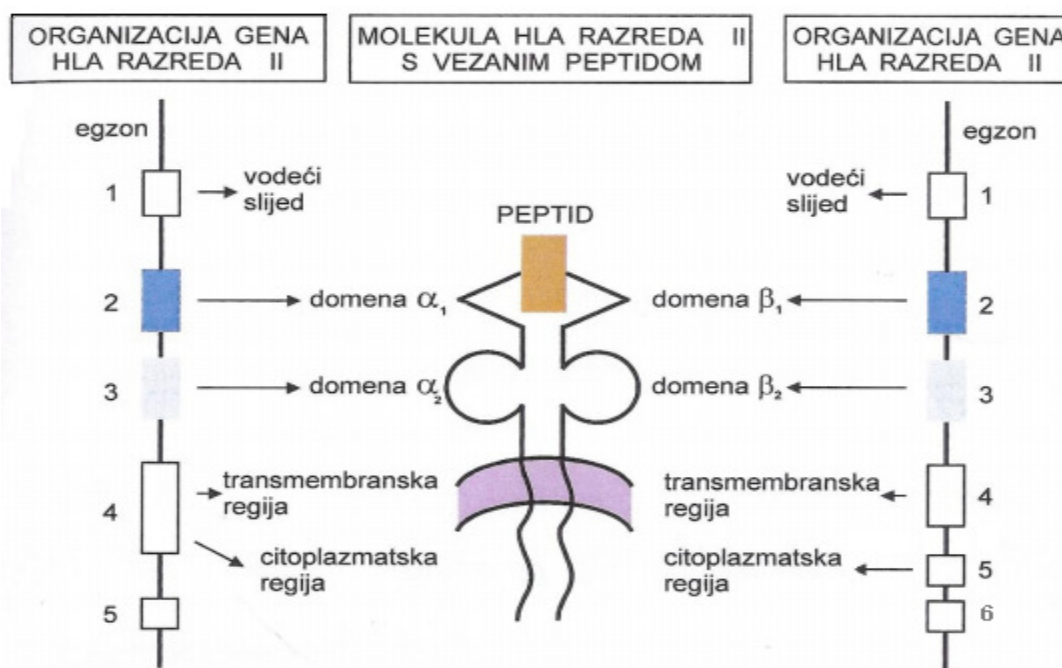
Slika 6. Shematski prikaz organizacije egzona gena HLA razreda I i molekule HLA razreda I

1.3.4. Geni i molekule HLA razreda II

Struktura gena HLA razreda II, slična je strukturi gena HLA razreda I i kodiraju molekule HLA razreda II koje su građene od težeg (α) lanca i lakšeg (β) lanca. Lanac α kodira gen građen od 5, a lanac β kodira gen građen od 6 egzona. Egzon 1 kodira vodeći peptid, a egzoni 2 i 3 kodiraju dvije izvanstanične domene. Egzon 4 kodira transmembransko područje, a egzon 5 citoplazmatsko. Oba ova područja kodira egzon 4 u genima za α lanac. (102) Molekule HLA razreda II nalaze se na antigen prezentirajućim stanicama (dendritičkim stanicama, makrofagima, B limfocitima), limfatičkom tkivu, epitelnim i endotelnim stanicama. (103) Razlike između pojedinih alela HLA razreda II većinom se nalaze u egzonu 2 lakog i teškog lanca. Iz toga se može zaključiti da egzon 2 kodira veznu pukotinu odnosno mjesto za vezanje peptida (slika 7).

Iz navedenog, proizlazi da svaka podregija HLA razreda II ima gene koji kodiraju sintezu oba lanca (α i β) molekule HLA razreda II i to po jedan funkcionalni gen A i B koji kodiraju odgovarajući α , odnosno β lanac.

Molekule HLA razreda II građene su od dva slična, nekovalentno vezana polimorfna lanca α i β . Molekula HLA razreda II, 2/3 lakog i teškog lanca ima izvan stanice, a vezna pukotina je prostranija i šire strukturirana. U pukotinu molekule HLA razreda II vežu se duži peptidi koji se u prosjeku sastoje od 15 (10-30) aminokiselina. Izvanstanični dio molekule se sastoji od četiri domene: α_1 , α_2 , β_1 i β_2 . Dio molekule HLA razreda II koje čine domene α_2 i β_2 sudjeluju u nekovalentnom povezivanju lanaca molekule HLA razreda II. (104)



Slika 7. Shematski prikaz organizacije egzona gena HLA razreda II i molekule HLA razreda II

1.3.5. Uloga gena HLA u imunološkoj reakciji

Vodeća uloga gena HLA je u imunološkoj reakciji obrane organizma od stranih antigena i to na način prezentacije peptida molekulama imunološkog sustava te pokretanje imunološke reakcije s ciljem uklanjanja stranog antigena. Razlike između molekula HLA razreda I i II su u tkivnoj raspodjeli i zastupljenosti,

tipu stanica kojima antigen prezentiraju i tipu antigena koje prezentiraju na svojim membranama. Isto tako reguliraju proizvodnju specifičnih antitijela, međudjelovanje stanica tijekom imunološke reakcije, proizvodnju komponenti komplementa i još nekih drugih komponenti imunološke reakcije.

Molekule HLA razreda I prezentiraju strani antigen citotoksičnim limfocitima T (CD8+), koji svojim specifičnim receptorom za antigen prepoznaju kompleks antigena tkivne podudarnosti vlastitoga organizma i u stanici prerađenog dijela ili dijelova stranog antigena. Molekula HLA ima jedno vezno mjesto za antigen i na to mjesto može radi svojstva polimorfnosti vezati različite antigene, ali istovremeno jedna molekula može vezati samo jedan antigen. Molekule HLA razreda I ulaze i u reakciju s različitim NK (engl. Natural Killer, NK) inhibitorским receptorima i tako štite integritet zdrave stanice od autoimunog djelovanja NK.

Molekule HLA razreda II prezentiraju strane antigene pomoćničkim limfocitima T (CD4+). Fagocitirani strani antigen se u stanici razgrađuje na peptidne dijelove koji se vežu na specifični dio molekule HLA razreda II i kao kompleks putuju na membranu antigen prezentirajuće stanice. Kompleks antigena na staničnoj membrani prepoznaju pomoćnički T limfociti (CD4+), vežu se za kompleks i tako započinju imunološki odgovor.

1.3.6. Povezanost sustava HLA s karcinogenezom i bolestima bubrega

Nekontrolirani rast stanica koje se razlikuju od tkiva iz kojeg potječu temelji se na modelu koji govori o promjenama u prezentaciji površinskih molekula na tumorskim stanicama koje su odgovorne za neprepoznavanje od strane vlastitog imunološkog sustava. Stanice gube regulatorne mehanizme kontroliranog rasta na način da razni karcinogeni ili onkogeni virusi djeluju na aktivaciju ili supresiju gena koji posljedično narušavaju mehanizme odgovorne za kontroliranu proliferaciju i popravke mutacija u genomu. (105-108)

Posljedica tih događanja su strukturne i funkcionalne promjene molekula HLA, promjene u ekspersije tumorskih antigena, nedostatak citokina koji suprimiraju proliferaciju i drugih mehanizama koji direktno i/ili indirektno sudjeluju u imunološkom prepoznavanju. Svi ti događaji dovode do stanja u kojem imunološki sustav više ne može prepoznati tumorske stanice i koje na taj način "bježe" kontroli imunološkog sustava.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da niti jedan alel HLA razreda I i II nije povezan s povećanom pojavnosti bilo kojeg karcinoma (do sada istraživanog) već je pokazano da su pojedini aleli HLA više zastupljeni u nekim vrstama karcinoma, zatim da su povezani s dužinom preživljenja ili prognozom, kao i da su povezani sa stadijem tumora, uspjehom imunoterapije kao i procjenom napredovanja bolesti. (109-111)

Istraživanja povezanosti sustava HLA i pojedinih karcinoma otkrila su da je gen HLA-A*02 povezan s lošijim ishodom među bolesnicima koji su bolovali od karcinoma pluća, prostate i jajnika. Jedno od mogućih objašnjenja je i da gen HLA-A*02 djeluje na onkosupresor gene i na taj način povećava ekspresiju malignih stanica i lošiju prognozu kod bolesnika nositelja ovog gena. (112-114)

Brojni radovi uočili su pojavu smanjenog ili potpunog gubitka ekspresije molekula HLA razreda I na površini stanica nekih solidnih tumora (npr. kolorektalni karcinom, melanom, karcinom dojke, karcinom vrata maternice i tumorima hematopoetske loze). (115-120) Istovremeno je poznato da smanjena ekspresija ili nedostatak molekula HLA razreda I na površini stanica ima za posljedicu poremećaj mehanizma obrade i prezentacije antigena prije nego strukturnih promjena same molekule HLA. (121, 122)

Neprekidni napredak i razvoj metoda određivanja tj. tipiziranja gena/alela/molekula HLA dovela je do boljeg razumijevanja povezanosti sustava HLA i brojnih bolesti, a posljedično tome i povezanosti s bolestima bubrega. Pokazano je da su pojedini geni HLA rizični čimbenici za bubrežne bolesti koje su posredovane imunološkim sustavom, te zajedno s drugim genetskim faktorima dovode do gubitka tolerancije na vlastite antigene i nastanka autoimune bolesti bubrega. (123, 124) Tako su na primjer istraživanja Goodpasture-ove bolesti bubrega i gena HLA utvrdila da HLA-DR1 i HLA-DR15, zbog različitog afiniteta vezanja peptida dovode do zaštite, odnosno do povećanja rizika za nastanak bolesti. (123, 124) Naime, povezanost sustava HLA i Goodpasture-ove bolesti prvi put se spominje još 1978. godine kada je otkrivena povezanost s antigenom HLA-DR2 (kasnije se utvrdilo da se antigen HLA-DR2 dijeli na dva antigena HLA-DR15 i -DR16). Međutim, primjenom molekularnih metoda utvrđeno je da je povezanost samo s alelom HLA-DRB1*15:01, ali ne i s drugim alelima gena HLA-DRB1*15, odnosno gena HLA-DRB1*16. Povezanost Goodpasture-ove bolesti i alela HLA-DQB1*06:02 utvrđena u nekim radovima posljedica je neravnoteže udruživanja

između alela HLA-DQB1*06:02 i HLA-DR15. (125) S druge strane, za antigene HLA-DR1, HLA-DR7 kao i alel HLA-DPB1*04:01 utvrđeno je da imaju zaštitni učinak za razvoj Goodpasture-ove bolesti. (126)

Još jedna bolest bubrega, membranska nefropatija, bolest kod koje se na glomerularnoj membrani koja zadeblja odlažu imunokompleksi, povezana je s pojedinim specifičnostima HLA. Rezultati istraživanja utvrdili su postojanje višestruko povećanog rizika za pojavu membranske nefropatije kod osoba pozitivnih za antigen HLA-DR3, odnosno antigen HLA-DQ2. Povezanost pojedinih bolesti bubrega i sustava HLA prikazana je u tablici 4.

Na temelju dosadašnjih istraživanja prevladava mišljenje da molekule HLA imaju podložnu, odnosno zaštitnu ulogu u nastajanju bolesti promjenama u ekspresiji ili stabilnosti ili uslijed modifikacije antigenih peptida. (127) Međutim, točan mehanizam imunološki posredovanih bolesti, a kojeg sustav HLA regulira na razini prepoznavanja peptida i T staničnog receptora bit će, najvjerojatnije u budućnosti temelj razvoja ciljane terapije za takve bolesti. (127-130)

Tablica 4. Prikaz povezanost pojedinih antigena/gena/alela HLA i različitih bolesti bubrega

LOKUS	SEROLOŠKI EKVIVALENT	BOLEST	RIZIK
HLA RAZRED I			
HLA-A2	HLA-A2	Dijabetična nefropatija	+
		Penicilin povezan-AIN	++
HLA-A*11:01	HLA-A11	IgAN	+
HLA-B8	HLA-B8	Penicilamin i/ili "gold-associated" membranska nefropatija	++
HLA-B35	HLA-B35	IgAN i Henoch–Schönlein purpura	+
HLA RAZRED II			
HLA-DRB1*01:01	HLA-DR1	Goodpasture-ova bolest	zaštita
HLA-DRB1*01:02	HLA-DR1	TINU	+
HLA-DR3	HLA-DR3	Penicilamin i/ili "gold-associated" membranska nefropatija	++
HLA-DRB1*03:01	HLA-DR17(3)	Lupus nefritis	++

HLA-DRB1*04	HLA-DR4	Dijabetična nefropatija	++
		IgAN	++
		Goodpasture-ova bolest	+
HLA-DR7	HLA-DR7	Steroid-senzitivni nefrotski sindrom	+
HLA-DRB1*07:01	HLA-DR7	Goodpasture-ova bolest	zaštita
HLA-DRB1*09:01	HLA-DR9	MPO-AAV	+
HLA-DRB1*09:01	HLA-DR9	Goodpasture-ova bolest	zaštita
HLA-DRB1*11:01	HLA-DR11	MPO-AAV	+
HLA-DRB1*15	HLA-DR15	Lupus nefritis	+
HLA-DRB1*15	HLA-DR15	PR3-AAV	++
HLA-DRB1*15:01	HLA-DR15	Goodpasture-ova bolest	+++
		Membranska nefropatija (uključujući povezanost s B-hepatitisom)	++
HLA-DQA1*05:01	HLA-DQ5	Membranska nefropatija	++
HLA-DQA1*05:01	HLA-DQ5	Penicilamin i/ili "gold-associated" membranska nefropatija	++
HLA-DQB1*02:01	HLA-DQ2	Membranska nefropatija	++
HLA-DQB1*03:01	HLA-DQ7	IgAN	++
HLA-DQB1*03:02	HLA-DQ8	Dijabetična nefropatija	++
HLA-DQB1*03:02	HLA-DQ8	Dijabetična nefropatija	++
HLA-DPB1*04:01	HLA-DPw4	Goodpasture-ova bolest	zaštita
HLA-DPB1*04:01	HLA-DPw4	PR3-AAV	+++

Kazalo: AAV-anti-neutrofilna citoplazmatska antitijela-povezana s vaskulitisom; AIN-alergijski intersticijski nefritis; FSGS, fokalna i segmentalna glomeruloskleroza; IgAN, imunoglobulin A nefropatija; MCD-bolest minimalnih promjena; MPO-mijeloperoksidaza; NA nije primjenjivo; PR3, proteinaza 3; TINU, tubulointersticijski nefritis i uveitis. Učinci rizika kategorizirani su kao + do +++ procijenjeni na temelju broja i veličine studija, omjera šansi i znanstvenog objašnjenja. Membranska nefropatija je 'primarno' anti-PL A2R (sekretorna fosfolipaza A2 receptor)-protutijelo-pozitivna membranska nefropatija osim ako nije drugačije navedeno.

2. HIPOTEZA

Geni HLA su povezani s rizikom za nastanak EN, odnosno karcinoma urotela gornjega urotrakta u bolesnika s EN.

3. CILJEVI

3.1. OPĆI CILJEVI

U skupini bolesnika s EN podijeljenih u skupinu s UUC i skupinu bez UUC ispitati povezanost gena HLA s nastankom i kliničkim tijekom bolesti.

3.2. SPECIFIČNI CILJEVI

1. Istražiti povezanost gena HLA s rizikom za nastanak EN.
2. Istražiti povezanost gena HLA s rizikom za nastanak karcinoma urotela gornjega urotrakta u bolesnika sa EN.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. ISPITANICI

Plan istraživanja je odobren od strane Etičkih povjerenstava Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičkog povjerenstva Opće bolnice "Dr. Josip Benčević" u Slavonskom Brodu.

Svi ispitanici su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

4.1.1. Skupina oboljelih ispitanika

U ovom istraživanju analizirali smo 111 uzoraka periferne krvi EN bolesnika oba spola u dobi od 55 do 88 godina liječenih na Odjelu za urologiju i Odjelu za internu medicinu u Općoj bolnici "Dr. Josip Benčević" u razdoblju 2005.-2018. godine. Dijagnozu EN postavili smo na osnovu anamnestičkih podataka o prebivalištu u endemskom području, pozitivnoj obiteljskoj anamnezi za EN i/ili UUC i/ ili hemodijalizi kod bolesnika koji se nisu prethodno liječili u OB "Dr. Josip Benčević" ili prema medicinskoj dokumentaciji u drugim zdravstvenim ustanovama, kliničkoj slici i laboratorijsko dijagnostičkim pretragama. Skupinu EN bolesnika podijelili smo u podskupinu u kojoj se pojavio UUC, na podskupine kod kojih se bolest pojavila prije i poslije 65. godine života i druge. U skupini EN bolesnika (N=111) bilo je podjednak broj muškaraca (n=56; 50,5%) i žena (n=55; 49,5%). Medijan životne dobi cijele skupine bolesnika bila je 70 g. (36. g.-87. g.). Podskupina EN bolesnika kod koje se bolest pojavila prije 65. g. života (N=46; 41,4%) od čega je muškaraca bilo (n=29; 63%) i žena (n=17; 37%), a podskupina EN bolesnika kod koje se bolest pojavila nakon 65. g. života (N=65;58,6%) sastojala se od muškaraca (n=27; 47,5%) i žena (n=38; 58,5%). Skupinu EN bolesnika podijelili smo i na bolesnike kod kojih se pojavio UUC i na one bez UUC. Podskupina EN bolesnika s UUC brojala je 52 bolesnika (N=52; 46,8%), od toga bilo je 23 muškarca i 29 žena. Ako ovu podskupinu EN bolesnika s UUC podijelimo na skupinu kod koje se bolest pojavila prije 65 g. života dobijemo broj (N=32; 54,2%), od toga muškaraca (n=9; 64,3%) i žena (n=5; 35,7%).

Podskupina EN bolesnika s UUC kod koje se bolest pojavila poslije 65.godine života broji 38 bolesnika (N=38; 73,1%), od toga muškaraca (n=14; 36,8%) i žena (n=24; 63,2%). U podskupini EN bolesnika s UUC bilo je 59

bolesnika (N=59; 53,2%) kod kojih se bolest pojavila poslije 65.g. života. U ovoj podskupini se bolest podjednako pojavila obzirom na životnu dob prije i poslije 65.g. života (<65 (N=32; 54,2%), ≥65 (N=27; 45,8%)). U ovoj podskupini bolesnika bez UUC kod koje se bolest pojavila prije 65.g. života bilo je nešto više muškaraca spram žena M (n=20; 62,5%) : Ž (n=12; 37,5%). Medijan praćenja skupine EN bolesnika bio je 9 godina. U tablici 5 prikazani su demografski podaci o istraživanoj skupini bolesnika.

Tablica 5. Demografski podaci o ispitivanoj skupini bolesnika s endemskom nefropatijom

BOLESNICI S ENDEMSKOM NEFROPATIJOM (N=111)		
Spol	n (%)	
Muškarci	56 (50,5)	
Žene	55 (49,5)	
Životna dob u trenutku dijagnoze		
Raspon	36 g. – 87 g.	
Median	70 g	
	Muškarci n (%)	Žene n (%)
<65 g. (N=46; 41,4%)	29 (63,0)	17 (37,0)
≥65 g. (N=65; 58,6%)	27 (41,5)	38 (58,5)
Praćenje bolesnika		
Raspon	0 – 33 g.	
Median	9 g.	
UUC neg (N=59; 53,2%)		

<65 g. (N=32; 54,2%)	20 (62,5)	12 (37,5)
≥65 g. (N=27; 45,8%)	13 (48,1)	14 (51,9)
UUC poz (N=52; 46,8%)		
<65 g. (N=14; 26,9%)	9 (64,3)	5 (35,7)
≥65 g. (N=38; 73,1%)	14 (36,8)	24 (63,2)
Vrsta karcinoma		
C65 (N=20; 38,5%)	9 (45,0)	11 (55,0)
C66 (N=25; 48,1%)	12 (48,0)	13 (52,0)
C65+C66 (N=7; 13,4%)	2 (28,6)	5 (71,4)

Kazalo: C65-karcinom bubrežne čašice i nakapnice; C66-karcinom mokraćovoda: n-broj bolesnika; UUC-karcinom urotela gornjega urotrakta;

4.1.2. Skupina članova obitelji EN bolesnika

Osim EN bolesnika analizirali smo skupinu od 52 zdrava srodnika, odnosno članova uže obitelji (braća, sestre, djeca) koji žive na endemskom području. Svi članovi obitelji uključeni u istraživanje bili su zdravi na osnovu anamneze i laboratorijskih nalaza .

4.1.3. Kontrolna skupina

Kontrolna skupina obuhvaćala je 190 zdravih nesrodnih ispitanika odgovarajuće dobi i spola iz Brodsko-posavske županije.

4.2. MATERIJALI

Svim ispitanicima uzet je uzorak periferne krvi (5 ml) s antikoagulansom EDTA, koji je dalje korišten za određivanje polimorfizma gena HLA razreda I i II. Tipizacija gena HLA izvedena je u Odjelu za tipizaciju, Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju KBC-a Zagreb.

4.3. METODE

4.3.1. Kliničke metode

4.3.1.1. Dijagnoza EN

Dijagnozu EN postavili smo na temelju anamnestičkih podataka o boravku u EN kućanstvu ili na endemskom području, odnosno pozitivnoj obiteljskoj anamnezi, izloženosti rizičnim čimbenicima, kroničnom programu hemodijalize pri tome isključujući ostale čimbenike kronične bubrežne insuficijencije (povišeni krvni tlak, dijabetes i druge bolesti), ultrazvučnog nalaza (mali skvrčeni bubreg, tanki korteks, ali i urednog UZV nalaza bubrega) podatka o liječenju karcinoma urotela gornjega urotrakta kao i laboratorijskih parametara.

U svrhu određivanja laboratorijskih parametara bolesnicima je vađena krv za analizu (KKS, serumski kreatinin, i ostalih rutinskih laboratorijskih parametara), a u nekim slučajevima određivao se i klirens kreatinina u 24 h urinu i proteinurija. Hemoglobin (KKS) se određivao na hematološkom analizatoru Sysmex XN-1000, Mes (Sysmex Corporation, 1-2-3 Murotani, Nishi-ku, Kobe 651-2241, Japan). Kreatinin u serumu se određivao enzimskom metodom na biokemijskom analizatoru Alinity c, Abbott (Abbott Park Illinois, USA). Albumin (i/ili mikroalbumin) u urinu se određivao kvantitativno imunoturbidimetrijskom metodom na biokemijskom analizatoru DxC 700 AU, Beckman Coulter (Beckman Coulter Inc. 250 c Kraemer Blvd Brea CA 92821, USA).

Vrijednost bubrežne funkcije procijenjena je na osnovu mjerenja glomerularne filtracije formulom CKD-EPI iz 2009. g. (za žene kod kojih je vrijednost serumskog kreatinina $\leq 65 \mu\text{mol/L}$; $e\text{GFR}=144 \times (\text{kreat}/62)^{-0.329} \times (0,993)^{\text{godine}}$, serumski kreatinin $>65 \mu\text{mol/L}$; $e\text{GFR}=144 \times (\text{kreat}/62)^{-1.209} \times (0,993)^{\text{godine}}$; za muškarce kod kojih je vrijednost serumskog kreatinina $\leq 80 \mu\text{mol/L}$; $e\text{GFR} = 144 \times (\text{kreat}/80)^{-0.411} \times (0.993)^{\text{godine}}$, serumski kreatinin $>80 \mu\text{mol/L}$; $e\text{GFR}=144 \times (\text{kreat}/80)^{-1.209} \times (0,993)^{\text{godine}}$). Na osnovu procijenjene glomerularne filtracije određuje se stadij bubrežne insuficijencije prema KDOQI (engl. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative). (131)

4.3.1.2. Dijagnoza UUC-a

Dijagnozu UUC postavili smo na osnovu anamnestičkih podataka o prebivalištu na endemskom području, podataka o pozitivnoj obiteljskoj anamnezi na karcinom urotela gornjega urotrakta, orijentacijskom ultrazvučnom pregledu urotrakta u smislu vidljivih promjena u kanalnom sustavu bubrega koje upućuju na ekspanzivni proces ili posljedičnu hidronefrozu kao rezultat opstrukcije kanalnog sustava tumorskim procesom, hematurije i pozitivnim nalazom malignih stanica u urinu ili već ranije liječenom UUC.

Od neinvazivnih pretraga u svrhu postavljanja dijagnoze UUC-a koristili smo intravensku urografiju (IVU), kompjuteriziranu urografiju (CTU) i urografiju magnetskom rezonancom (MRU).

4.3.1.3. Hematurija

Dijagnoza hematurije postavljena je na temelju mikroskopskog pregleda sedimenta urina pri kojem je rezultat bio ≥ 3 eritrocita po vidnom polju mikroskopa velikog povećanja.

4.3.1.4. Citološka analiza urina

Citološka analiza urina korištena je u svrhu otkrivanja malignih stanica. Za analizu uzimao se drugi jutarnji urin tri dana uzastopno. Svaki uzorak obrađen je od trenutka uzorkovanja u vremenu od 30 minuta u kojem je urin pripremljen za citološku analizu. Urin (0,5 ml) se centrifugirao 1500 okr/3min, nakon toga su se stanice u sedimentu bojale May-Grunwald-Giemsom po Pappenheimu. Kod dijela bolesnika za citološku analizu urina uzimali su se urini posebno iz desnog i lijevog bubrega te mokraćovoda.

4.3.1.5. Intravenska urografija (IVU)

Intravenska ili ekskrecijska urografija se koristila za detekciju UUC. Kao metoda koristi konvencionalnu rendgensku cijev i rentgensko zračenje prilikom koje se bolesniku ubrizga jedno vodotopivo kontrastno sredstvo u venu koje se potpuno izlučuje putem bubrega iz organizma. Na slikovnim prikazima IVU, UUC se prezentirao kao "defekt punjenja kanalnog sustava" bubrežnih čašica

nakapnice i mokraćovoda. Kao rutinska pretraga IVU se koristila u Općoj bolnici "Dr. Josip Benčević" sve do 2017. godine.

4.3.1.6. Kompjuterizirana urografija (CTU)

Za dijagnozu UUC koristili smo CTU koja se izvodila na aparatu Siemens Somatom Definition 128. Metoda CTU koristi rentgenske zrake uz intravesnu primjenu vodotopivog jodkontrastnog sredstva. Na osnovu višeslojnih snimaka urotakta, MSCT (engl. multislice computed tomography), bili smo u mogućnosti dobiti slikovni prikaz tumorskih promjena kanalnog sustava gornjeg urotakta u vidu defekta punjenja kontrasta kanalnog sustava, zadebljanih stijenki čašica, nakapnice i mokraćovoda) ili neprikazivanja djelomično ili u cijelosti kanalnog sustava. Kompjuteriziranom urografijom dijagnosticirali smo UUC u bolesnika kod kojih je vrijednost ureje i kreatinina bila u granicama normalnih laboratorijskih vrijednosti ili u bolesnika kod kojih je zbog bubrežne insuficijencije, bubrežna funkcija nadomještena hemodijalizom.

4.3.1.7. Magnetska rezonanca (MR)

Kod bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom kod kojih bi primjena jodkontrastnog sredstva mogli pogoršati već narušenu bubrežnu funkciju ili kod bolesnika koji su alergični na jodna kontrastna sredstva za dijagnostiku UUC služili smo se magnetnom urografijom s gadolinijem, kontrastnim sredstvom koje znatno manje opterećuje i oštećuje bubrežnu funkciju intravenskom primjenom kao i kod bolesnika kao dodatnu dijagnostičku metodu. MR urografija za dijagnozu UUC rađena je na uređaju Siemens Magnetom Essenza 1,5 T.

Od invazivnih pretraga koristili smo endoskopske metode cistoskopiju i ureteropijeloskopiju.

4.3.1.8. Cistoskopija

Cistoskopija je endoskopska metoda pregleda mokraćnog mjehura kojom se pomoću optičkog instrumenta uvedenog u mokraćni mjehur vizualizira njegova unutrašnjost, a mi smo je koristili prvenstveno da bismo isključili istodobno postojanje tumora mokraćnog mjehura i UUC.

4.3.1.9. Ureteropijeloskopija

Ureteropijeloskopija je endoskopska metoda kojom se pomoću semirigidnog i fleksibilnog ureterorenoskopa može direkto vizualizirati lumen uretera, bubrežne nakapnice i bubrežnih čašica i patološke promjene u njima, a isto tako uzimati materijal uočenih patoloških promjena biopsijom za patohistološku dijagnozu.

4.3.2. Tipizacija HLA

4.3.2.1. Izolacija DNA

Za izolaciju DNA koristili smo metodu automatske izolacije na način da smo iz 200 µl uzorka periferne krvi ispitanika izolirali DNA pomoću komercijalnog seta za izolaciju DNA (MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, Roche, Rotkreuz, Švicarska) na uređaju MagNA Pure Compact. Metoda počiva na principu liziranja stanica u uzorku periferne krvi pomoću pufera za razgradnju stanica i proteinkinaze K. Nakon postupka lize stanica molekule DNA se specifično vežu na površinu magnetskih kuglica koje se potom izdvajaju pomoću magneta. Potom se uzorci DNA ispiru, a DNA se denaturira postupkom zagrijavanja na visokoj temperaturi i tako odvaja od magnetskog nosača.

4.3.2.2. Određivanje gena i alela HLA metodom lančane reakcije polimerazom i s oligonukleotidnim probama specifičnih sekvenci (PCR-SSO)

Za određivanje polimorfizama HLA koristili smo se metodom lančane reakcije polimerazom i oligonukleotidima sa sekvencama specifičnim za genske skupine HLA (engl. Polymerase Chain Reaction–Sequence-Specific Oligonucleotides, PCR-SSO). Za određivanje gena HLA razreda II umnaža se egzon 2 i egzon 3, dok se za tipizaciju gena HLA razreda II umnaža samo egzon 2. (132) Određivanje gena HLA proveli smo uz pomoć komercijalnog seta LIFECODES (Gen-Probe Transplant Diagnostics, Stamford, SAD). Metoda se temelji na hibridizaciji označenog produkta PCR s oligoprobama specifičnim za slijed nukleotida. Umnažanje DNA provodi se metodom lančane reakcije polimeraze, pri čemu se koriste početnice specifične za pojedini lokus HLA. U reakciji umnažanja koriste se dvije početnice (5' i 3'), pri čemu je jedna početnica

prisutna u suvišku. Na taj način će u početnim ciklusima reakcije umnažanja nastajati dvolančana DNA kao produkt samog umnažanja. Jednom kad se iscrpi količina ograničavajuće početnice, u slijedećim koracima će se uz pomoć preostale početnice, stvarati jednolančana DNA. Prema preporuci proizvođača koncentracija DNA za navedeni test iznosi 50-100 ng/μl. Umnožene molekule DNA nakon denaturacije sudjeluju u hibridizacijskoj reakciji. Ukupni volumen jedne reakcije PCR iznosi 20,2 μl (6 μl Lifecodes Master Mix, 9 μl H₂O, 0,2 μl Taq polimeraze i 5 μl uzorka testirane DNA. I dvolančana i jednolančana DNA će, nakon postupka denaturacije, biti korištene u reakciji hibridizacije. Oligoprobe (za svaki lokus HLA broj proba je različit) koje se koriste u reakciji hibridizacije su homologne sa slijedom nukleotida u umnoženoj DNA koji je jedinstven ili za alel ili za skupinu alela HLA.

Probe se potom hibridiziraju s komplementarnom regijom ukoliko je ta regija prisutna u umnoženoj DNA, odnosno ukoliko je osoba kojoj se određuju aleli na pojedinom lokusu HLA nositelj alela s tim specifičnim slijedom nukleotida. Ukupni volumen jedne hibridizacijske reakcije iznosi 20 μl (5 μl produkta PCR-a i 15 μl otopine mikrosfera). Za reakciju hibridizacije potrebno je 20 minuta, a potom se hibridizacijskoj reakciji dodaje otopina fluorescentne boje za obilježavanje (170 μl pufera za razrjeđenje i 0,85 μl streptavidina). Streptavidin se veže na biotinizirane dijelove DNA koje su specifično vezane s probama na određenim mikrosferama.

U reakciji hibridizacije također se koriste i tzv. "konsensus" oligoprobe (tzv. pozitivne kontrole) koje imaju slijed nukleotida homologan slijedu nukleotida prisutnom na svim alelima pojedinog lokusa HLA. Na taj način se kontrolira uspjeh samog postupka umnažanja i hibridizacije, oligoprobe su vezane za Luminex mikrosfere koje su napravljene za uporabu u Luminex aparatu (Luminex Corp., Austin, SAD). Budući su populacije mikrosfera obilježene s jedinstvenom fluorescentnom bojom, aparat može istovremeno očitati i razlikovati signal sa 100 različitih mikrosfera. To znači da se pojedine oligoprobe mogu razlikovati s obzirom na fluorescentnu boju mikrosfere na koju su vezane. Luminex aparat može odrediti relativnu količinu označenog produkta PCR koji se hibridizirao s oligoprobom na pojedinoj mikrosferi te na taj način, prema jačini dobivenog signala, odrediti da li je za pojedinu probu došlo do hibridizacije (pozitivna reakcija) ili ne (negativna reakcija), što zauzvrat daje informaciju o tome koji je alel HLA, odnosno gen HLA, prisutan u analiziranom uzorku na testiranom lokusu HLA. Za analizu pozitivnih i

negativnih rezultata hibridizacije i određivanje genskih skupina HLA koristili smo analitički program MatchIT (Immucor, Stamford, USA).

4.3.2.3. Određivanje gena i alela HLA metodom lančane reakcije polimerazom i početnicama specifičnih sekvenci (PCR-SSP)

Metoda PCR-SSP (engl. Polymerase Chain Reaction–Sequence-Specific Primers), koristi specifične početnice tijekom PCR reakcije te se umnožavaju različite grupe ili pojedini alel HLA. (133) Testovi se sastoje od različitog broja početnica ovisno koji se gen umnaža tj. analizira. Sve reakcije sa specifičnim početnicama sadrže i kontrolni par početnica za umnožavanje pozitivne kontrole u svrhu provjere reakcijskih komponenti i ispravnosti testa. Rezultati PCR-SSP metode očitavaju se pomoću agarozne gel elektroforeze (1,5% gel). To je metoda kojom se fragmenti DNA razdvajaju kroz polimernu strukturu agaroznog gela u polju istosmjerne struje. Umnožene djelove DNA koje dobijemo ovom metodom potrebno je obojiti fluorescentnom bojom radi dalje identifikacije. U pripremljenu otopinu agaroznog gela dodamo fluorescentnu boju, izlijemo u kalup u kojem poprima strukturu gela i tako pripremljenog stavljamo u kadicu za elektroforezu s puferom. Prilikom svake elektroforeze potrebno je koristiti tzv. DNA marker, točno određenog broja i veličine fragmenata DNA. Određujemo veličinu amplificiranih fragmenata DNA u našim uzorcima. Postupak elektroforeze traje 25 minuta uz jakost struje 150 mA i napona od 160 V. Kao rezultat elektroforeze PCR produkata u gelu vide se razdvojene vrpce uzoraka DNA koje pod UV svjetlom fluoresciraju radi fluorescente boje vezale za molekule DNA.

Za analizu rezultata korištene su baze alela IPD-IMGT/HLA 3.31-3.35. (134)

4.4. STATISTIČKE METODE

Podatke smo analizirani deskriptivnom statistikom. Učestalost alela odredili smo uz pomoć GeneRate program (<http://geneva.unige.ch/ahpd/>). Program PyPop (<http://www.pypop.org>) korišten je za izračun Hardy-Weinberg ravnoteže (HWE), homozigotnosti (engl. Ewens-Watterson homozygosity) kao i analizu haplotipova dva, odnosno tri lokusa HLA. (135,136)

Povezanost pojedinih kliničkih i genetskih čimbenika procijenili smo uz pomoć 2x2 kontingencijske tablice (GraphPad software, QuickCalcs, www.graphpad.com) pri čemu je razina statističke značajnosti iznosila $P \leq 0,05$. Vrijednosti P testirane su i s ukupnim brojem uočenih alela HLA na pojedinom lokusu HLA i tako smo dobiti korigiranu vrijednost P (P_{corr}). U slučaju kada je broj pojedinog čimbenika bio manji od 5, koristili smo Fisher-ov test. Svakom paru uspoređenih gena, alela, haplotipova kojem je određena učestalost i pridružena P vrijednost, odredili smo i omjer šansi ili omjer izgleda OR (Odds ratio) koji govori o snazi povezanosti između "događaja bolesti" i izloženosti čimbenicima rizika. Kada je $OR < 1,00$ (95% CI $< 1,00$) izloženost čimbeniku smanjuje rizik za štetni događaj ili bolest i predstavlja zaštitni čimbenik. Kada je $OR = 1,00$ (95% CI sadrži 1,00) tada nema povezanosti događaja i izloženosti riziku, a kada je $OR > 1,00$ (95% CI $> 1,00$) tada izloženost povećava rizik za štetni događaj ili bolest te predstavlja rizični čimbenik.

Raspodjela alela i haplotipova HLA prikazane su tablično i grafički (histogrami).

5. REZULTATI

U tablici 6. prikazani su opći podaci o broju gena i alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1 za skupinu EN bolesnika i kontrolnu skupinu, kao i broj heterozigota HLA. U obje prikazane skupine podjednak je broj gena i alela za sva tri HLA lokusa. Nije nađena statistički značajna razlika između heterozigota uočenih i očekivanih između te dvije skupine.

Tablica 6. Broj uočenih gena i alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1 u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom (N=111) i zdravoj kontroli (N=190)

HLA-A	EN BOLESNICI (N=111)	KONTROLA (N=190)
BROJ GENA	14	16
Heterozigoti uočeni	93	159
Heterozigoti očekivani	93,11	159,64
BROJ ALELA	20	21
Heterozigoti uočeni	94	160
Heterozigoti očekivani	95,36	160,57
HLA-B		
BROJ GENA	27	27
Heterozigoti uočeni	102	178
Heterozigoti očekivani	102,14	176,43
BROJ ALELA	35	36
Heterozigoti uočeni	105	183
Heterozigoti očekivani	104,54	179,64
HLA-DRB1		
BROJ GENA	12	13
Heterozigoti uočeni	98	168
Heterozigoti očekivani	98,09	169,18
BROJ ALELA	26	30
Heterozigoti uočeni	101	177
Heterozigoti očekivani	102,33	175,93

Kazalo: EN - endemska nefropatija;

5.1. RASPODJELA GENA, ALELA I HAPLOTIPOVA LOKUSA HLA-A, -B i -DRB1 UNUTAR SKUPINE BOLESNIKA S ENDEMSKOM NEFROPATIJOM

5.1.1. Raspodjela gena lokusa HLA-A, -B i -DRB1

Raspodjela gena lokusa HLA-A, -B i -DRB1 praćena je unutar skupine bolesnika s EN te uspoređena sa zdravom kontrolom. Iz tablice 7 vidljivo je da je među bolesnicima otkriveno 14 razlićitih gena HLA-A, a u kontroli 16. Među bolesnicima s EN nisu uoćeni geni HLA-A*66 i HLA-A*69. U obje testirane skupine najćešće je bio prisutan gen HLA-A*02. Usporedba raspodjele gena ovog lokusa pokazala je statistićki znaćajno ($P=0,0181$) manju ućestalost gena HLA-A*01 među bolesnicima (7,7%) nego u kontroli (14,2%). Povišena ućestalost (14,9%) gena HLA-A*24 u skupini bolesnika s EN u usporedbi s kontrolom (10%) nije dostigla statićku znaćajnost.

Tablica 7. Raspodjela gena lokusa HLA-A u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom (N=111) i zdravoj kontroli (N=190)

HLA-A*	BOLESNICI S EN (N=111)		KONTROLA (N=190)		P
	n	GF	n	GF	
01	17	0,0766	54	0,1421	0,0181
02	68	0,3063	123	0,3237	0,7167
03	25	0,1126	41	0,1079	0,8928
11	12	0,0541	22	0,0579	1,0000
23	6	0,0270	9	0,0237	0,7920
24	33	0,1487	38	0,1000	0,0883
25	7	0,0315	9	0,0237	0,6043
26	19	0,0856	21	0,0553	0,1750
29	2	0,0090	3	0,0079	1,0000
30	3	0,0135	5	0,0132	1,0000
31	9	0,0405	8	0,0211	0,2029
32	11	0,0496	18	0,0474	1,0000
33	2	0,0090	10	0,0263	0,2263
66	-	-	1	0,0026	1,0000
68	8	0,0360	17	0,0447	0,6768
69	-	-	1	0,0026	1,0000

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uoćenih gena HLA - A; GF - ućestalost gena HLA-A

Analize raspodjele gena lokusa HLA-B i HLA -DRB1 u skupini bolesnika s EN uspoređena s kontrolnom skupinom prikazana su u tablicama 8 i 9. Među bolesnicima s EN nađeno je 27 različitih alela lokusa HLA-B naspram 26 u kontrolnoj skupini, (tablica 8). Najčešće zastupljeni gen u obje skupine bio je HLA-B*35. U skupini bolesnika s EN nije uočen gen HLA-B*58. Statistički značajna razlika između dvije prikazane skupine ($P=0,0369$) uočena je za gen HLA-B*57, koji je bio manje prisutan među bolesnicima (2,7%), nego u kontrolnoj skupini (6,8%).

Usporedba raspodjele gena lokusa HLA-DRB1, (tablica 9), između skupine bolesnika s EN i kontrolne skupine nije pokazala statistički značajnu razliku. U skupini bolesnika uočeno je 12, a u kontrolnoj skupini 13 gena HLA-DRB1. Najčešće uočeni gen HLA-DRB1 u obje skupine bio je HLA-DRB1*11. Snižena zastupljenost gena HLA-DRB1*08 (1,4%) u skupini bolesnika s EN u usporedbi s kontrolnom skupinom (3,9%) nije pokazala statistički značajnu razliku.

Tablica 8. Raspodjela gena lokusa HLA-B u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom (N=111) i zdravoj kontroli (N=190)

HLA-B*	BOLESNICI S EN (N=111)		KONTROLA (N=190)		P
	n	GF	n	GF	
07	16	0,0721	35	0,0921	0,4500
08	18	0,0811	26	0,0684	0,6270
13	7	0,0315	15	0,0395	0,8224
14(B64)	1	0,0045	1	0,0026	1,0000
14(B65)	3	0,0135	7	0,0184	0,7523
15(B62)	5	0,0225	9	0,0237	1,0000
18	21	0,0946	25	0,0659	0,2066
27	10	0,0451	24	0,0632	0,4646

35	39	0,1757	54	0,1421	0,2935
37	2	0,0090	3	0,0079	1,0000
38	16	0,0721	22	0,0579	0,4916
39	7	0,0315	14	0,0368	0,8210
40(B60)	2	0,0090	7	0,0184	0,4966
40(B61)	7	0,0315	6	0,0158	0,4288
41	1	0,0045	3	0,0079	1,0000
44	20	0,0901	30	0,0790	0,6481
47	1	0,0045	-	-	0,3688
48	1	0,0045	1	0,0026	1,0000
49	6	0,0270	11	0,0290	1,0000
50	2	0,0090	1	0,0026	0,5582
51	18	0,0811	37	0,0973	0,5595
52	4	0,0180	4	0,0105	0,4752
53	2	0,0090	4	0,0105	1,0000
54	1	0,0045	-	-	0,3688
55	2	0,0090	5	0,0132	1,0000
56	4	0,0180	3	0,0079	0,4324
57	6	0,0270	26	0,0684	0,0369
58	-	-	4	0,0105	0,3022

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih gena HLA-B; GF – učestalost gena HLA-B; () - serološki ekvivalent

Tablica 9. Raspodjela gena lokusa HLA-DRB1 u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom (N=111) i zdravoj kontroli (N=190)

HLA-DRB1*	BOLESNICI S EN (N=111)		KONTROLA (N=190)		P
	n	GF	n	GF	
01	23	0,1036	43	0,1132	0,7875
03	24	0,1081	34	0,0895	0,4759
04	24	0,1081	37	0,0974	0,6766
07	19	0,0860	45	0,1184	0,2206
08	3	0,0135	15	0,0395	0,0844
09	-	-	1	0,0026	1,0000
10	2	0,0090	2	0,0053	0,6282
11	40	0,1802	62	0,1632	0,6522
12	4	0,0180	7	0,0184	1,0000
13	22	0,0991	36	0,0947	0,8836
14	7	0,0315	10	0,0263	0,7999
15	21	0,0946	40	0,1053	0,7798
16	33	0,1487	48	0,1263	0,4589

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih gena HLA-DRB1; GF - učestalost gena HLA-DRB1

5.1.2. Raspodjela alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1

Usporedba raspodjele alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1 prikazane su u tablicama 10-12. Najčešći alel na lokusu HLA-A bio je HLA-A*02:01 u obje skupine ispitanika, dok je alel HLA-A*01:01 pokazao statsitički značajno smanjenu učestalost u skupini bolesnika s EN-om u usporedbi s kontrolom.

Na lokusu HLA-B najveću učestalost među bolesnicima s EN pokazao je alel HLA-B*18:01 (9,5%), a među kontrolnim ispitanicima najveću zastupljenost imao je alel HLA-B*51:01 (9,7%). Za dva alela ovog lokusa (HLA-B*27:05 i B*57:01) razlike u učestalostima između testiranih skupina bile su statistički značajne (tablica 11).

U prikazanoj raspodjeli alela lokusa HLA-DRB1 u skupini bolesnika najučestaliji alel bio je HLA-DRB1*16:01 (14%), a u kontrolnoj skupini alel HLA-DRB1*07:01 (11,8%). Statistički značajnu razliku u zastupljenosti između dvije testirane skupine pokazao je alel HLA-DRB1*04:02 (tablica 12).

Tablica 10. Raspodjela alela lokusa HLA-A u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom (N=111) i zdravoj kontroli (N=190).

HLA-A*	BOLESNICI S EN (N=111)		KONTROLA (N=190)		P
	n	AF	n	AF	
01:01	17	0,0766	54	0,1421	0,0181
02:01	66	0,2973	122	0,3211	0,5848
02:05	1	0,0045	1	0,0026	1,0000
02:22	1	0,0045	-	-	0,3688
03:01	25	0,1126	36	0,0947	0,4852
11:01	12	0,0541	22	0,0579	1,0000
23:01	6	0,0270	9	0,0237	0,7920
24:02	29	0,1351	38	0,1000	0,2828
24:03	3	0,0135	-	-	0,0497
24:07	1	0,0045	-	-	0,3688
25:01	7	0,0315	9	0,0237	0,6043
26:01	19	0,0856	21	0,0553	0,1750
29:02	2	0,0090	1	0,0026	0,5582
30:01	3	0,0135	4	0,0105	0,7126
31:01	7	0,0315	8	0,0211	0,4288
31:02	2	0,0090	-	-	0,1356
32:01	11	0,0496	18	0,0474	1,0000

33:01	2	0,0090	10	0,0263	0,2263
68:01	6	0,0270	14	0,0368	0,6403
68:02	2	0,0090	3	0,0079	1,0000

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih alela HLA-A; AF - učestalost alela HLA-A

Tablica 11. Raspodjela alela lokusa HLA-B u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom (N=111) i zdravoj kontroli (N=190)

HLA-B*	BOLESNICI S EN (N=111)		KONTROLA (N=190)		P
	n	AF	n	AF	
07:02	16	0,0720	33	0,0868	0,6434
08:01	18	0,0811	26	0,0684	0,6280
13:02	7	0,0315	13	0,0342	1,0000
14:01	1	0,0045	1	0,0026	1,0000
14:02	3	0,0135	7	0,0184	0,7523
15:01	4	0,0180	9	0,0237	0,7763
15:09	1	0,0045	-	-	0,3688
18:01	21	0,0946	25	0,0658	0,2065
27:02	7	0,0315	6	0,0158	0,2461
27:05	3	0,0135	18	0,0474	0,0369
35:01	19	0,0856	25	0,0658	0,4177
35:02	4	0,0180	-	-	0,0182
35:03	15	0,0676	26	0,0684	1,0000
35:08	1	0,0045	3	0,0079	1,0000
37:01	2	0,0090	3	0,0079	1,0000
38:01	16	0,0721	22	0,0579	0,4919

39:01	5	0,0225	11	0,0290	0,7950
39:03	1	0,0045	-	-	0,3688
39:06	1	0,0045	3	0,0079	1,0000
40:01	2	0,0090	7	0,0184	0,4966
40:02	7	0,0315	6	0,0158	0,2471
41:01	1	0,0045	1	0,0026	1,0000
44:02:01g	18	0,0811	22	0,0579	0,3095
44:03	2	0,0090	7	0,0184	0,4966
47:01	1	0,0045	-	-	0,3688
48:01	1	0,0045	1	0,0026	1,0000
49:01	6	0,0270	11	0,0290	1,0000
50:01	2	0,0090	1	0,0026	0,5582
51:01	18	0,0811	37	0,0974	0,5595
52:01	4	0,0180	4	0,0105	0,4752
53:01	2	0,0090	4	0,0105	1,0000
54:01	1	0,0045	-	-	0,3688
55:01	2	0,0090	5	0,0132	1,0000
56:01	4	0,0180	3	0,0079	0,4324
57:01	6	0,0270	26	0,0684	0,0369

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih alela HLA-B; AF - učestalost alela HLA-B; B*44:02:01g (B*44:02 ili B*44:27); () - serološki ekvivalent

Tablica 12. Raspodjela alela lokusa HLA-DRB1 u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom (N=111) i zdravoj kontroli (N=190)

HLA-DRB1*	BOLESNICI S EN (N=111)		KONTROLA (N=190)		P
	n	AF	n	AF	
01:01	20	0,0901	36	0,0947	0,8855
01:02	2	0,0090	6	0,0160	0,7167
01:03	1	0,0045	1	0,0026	1,0000
03:01	24	0,1081	34	0,0895	0,4759
04:01	6	0,0270	14	0,0368	0,6403
04:02	14	0,0631	9	0,0237	0,0252
04:03	-	-	5	0,0132	0,1636
04:04	3	0,0135	6	0,0160	1,0000
04:05	1	0,0045	1	0,0026	1,0000
04:07	-	-	1	0,0026	1,0000
04:08	-	-	1	0,0026	1,0000
07:01	19	0,0856	45	0,1184	0,2206
08:01	3	0,0135	13	0,0342	0,1884
08:02	-	-	1	0,0026	1,0000
08:04	-	-	1	0,0026	1,0000
09:01	-	-	1	0,0026	1,0000
10:01	2	0,0090	2	0,0053	0,6282
11:01	21	0,0946	30	0,0790	0,5451
11:03	1	0,0045	3	0,0080	1,0000
11:04	16	0,0720	29	0,0763	1,0000

11:12	2	0,0090	-	-	0,1356
12:01	4	0,0180	7	0,0237	1,0000
13:01	14	0,0063	22	0,0580	0,8591
13:02	5	0,0225	9	0,0237	1,0000
13:03	3	0,0135	3	0,0080	0,6746
13:05	-	-	2	0,0053	0,5337
14:01:01g	6	0,0270	10	0,0263	1,0000
14:05	1	0,0045	-	-	0,3688
15:01	17	0,0766	36	0,0947	0,5513
15:02	4	0,0180	4	0,0105	0,3134
16:01	31	0,1396	43	0,1132	0,3034
16:02	1	0,0045	5	0,0132	0,4215
16:03	1	0,0045	-	-	0,3688

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih alela HLA; AF - učestalost alela HLA; DRB1*14:01:01g (DRB1*14:01 ili DRB1*14:54)

5.1.3. Raspodjela haplotipova HLA

5.1.3.1. Raspodjela haplotipova HLA-B~DRB1 (niska rezolucija)

U tablici 13. prikazana je raspodjela haplotipova HLA-B~DRB1 na razini gena (niska rezolucija) u kojoj je između 23 prikazana haplotipa u skupini bolesnika s EN najzastupljeniji bio haplotip HLA-B*08~DRB1*03 (6,7%), a u kontroli između 20 prikazanih haplotipova, najčešći haplotip bio je HLA-B*07~DRB1*15 (5,1%). Najveću statističku značajnost ($P=0,0060$) pokazala je razlika u frekvenciji haplotipa HLA-B*18~DRB1*11 i HLA-B*44~DRB1*16 dok je haplotip HLA-B*38~DRB1*04 pokazao manje statistički značajnu P vrijednosti ($P=0,0447$).

Tablica 13. Raspodjela haplotipova[#] HLA-B~DRB1 u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom (N=111) i zdravoj kontroli (N=190)

HLA-B*~DRB1*	BOLESNICI S EN (N=111)		KONTROLA (N=190)		P
	n	HF	n	HF	
07~07	3,3	0,0147	2,5	0,0067	0,6746
07~13	3,0	0,0135	-	-	0,0981
07~15	7,7	0,0349	19,2	0,0506	0,6768
08~03	14,8	0,0666	18,0	0,0472	0,3536
13~07	4,0	0,0180	10,7	0,0280	0,5893
15(B62)~13	3,5	0,0158	3,8	0,0099	0,4752
18~11	12,3	0,0554	5,1	0,0135	0,0060
18~16	4,3	0,0193	3,5	0,0093	0,4752
27~16	7,0	0,0315	8,9	0,0236	0,6043
35~01	8,4	0,0377	11,8	0,0311	0,8155
35~03	3,1	0,0136	-	-	0,0981
35~04	4,4	0,0197	6,6	0,0174	1,0000
35~11	8,1	0,0367	16,7	0,0440	0,6768
35~16	3,2	0,0144	5,6	0,0147	1,0000
38~04	10,9	0,0493	7,3	0,0193	0,0447
39~16	6,0	0,0270	6,8	0,0179	0,5643
40(B61)~11	6,0	0,02703	3,0	0,0079	0,0767
44~04	3,0	0,0135	1,6	0,0043	0,3635
44~11	6,5	0,0292	7,0	0,0183	0,4010
44~16	7,5	0,0338	1,6	0,0130	0,0060
51~11	5,0	0,0225	14,3	0,0376	0,4696

51~13	4,4	0,0197	3,2	0,0083	0,4324
51~15	3,0	0,0135	-	-	0,0981

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih haplotipova HLA-B~DRB1; HF - učestalost haplotipa HLA-B~DRB1; () - serološki ekvivalent; # - u tablici su prikazani samo haplotipovi HLA-B~DRB1 uočeni $\geq 3x$ unutar skupine bolesnika

5.1.3.2. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija)

Među 19 haplotipova HLA-A~B~DRB1 prikazanih u tablici 14 razlika u učestalostima haplotipa HLA-A*24~B*35~DRB1*11 pokazala je najveću P vrijednost ($P=0,0024$). Za pet haplotipa HLA-A*02~B*08~DRB1*03 uočena razlika bila je statistički značajna ($P=0,0277$). Zanimljivo je istaknuti da je među EN bolesnicima najčešći haplotip bio HLA-A*01~B*08~DRB1*03 (4,1%), a među zdravim ispitanicima haplotip HLA-A*03~B*07~DRB1*15 (2,9%) koji je među bolesnicima pokazao učestalost od 1,8%.

Tablica 14. Prikaz haplotipova[#] HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija) u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom (N=111) i zdravoj kontroli (N=190)

HLA-A*~B*~DRB1*	BOLESNICI S EN (N=111)		KONTROLA (N=190)		P
	n	HF	n	HF	
01~08~03	9,0	0,0410	10,7	0,0282	0,4835
02~08~03	5,0	0,0225	1,3	0,0030	0,0277
02~18~11	7,9	0,0358	3,0	0,0079	0,0219
02~27~16	4,8	0,0218	7,0	0,0184	0,7672
02~39~16	3,0	0,0135	-	-	0,0981
02~44~16	4,9	0,0223	2,7	0,0071	0,1521
02~51~01	3,0	0,0135	6,0	0,0158	1,0000
02~51~04	3,0	0,0135	3,0	0,0078	0,6746
02~51~11	3,0	0,0135	8,0	0,0211	0,7541

02~52~15	3,0	0,0135	-	-	0,0981
03~07~15	4,0	0,0180	10,9	0,0287	0,5893
03~35~14	3,0	0,0135	-	-	0,0981
11~35~01	3,8	0,0173	-	-	0,0641
24~18~16	3,0	0,0135	-	-	0,0981
24~35~04	3,0	0,0135	-	-	0,0981
24~35~11	6,0	0,0270	-	-	0,0024
26~07~13	3,0	0,0135	-	-	0,0981
26~38~04	8,0	0,0360	6,0	0,0158	0,1589
68~35~11	3,0	0,0135	-	-	0,0981

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih haplotipova HLA-A~B~DRB1; HF - učestalost haplotipa HLA-A~B~DRB1; # - u tablici su prikazani samo haplotipovi HLA-A~B~DRB1 uočeni $\geq 2x$ unutar skupine bolesnika

5.1.3.3. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija)

Osim analize haplotipova HLA-A~B~DRB1 na razini gena (niska rezolucija) napravljena je i analiza haplotipova na razini alela HLA (visoka rezolucija) te su dobiveni rezultati prikazani u tablici 15. Među 15 haplotipova HLA-A~B~DRB1 uočenih $\geq 3x$ među bolesnicima haplotip HLA-02:01~B*27:02~DRB1*16:01 pokazao je statistički najveću razliku ($P=0,0024$) između skupina. Naime, haplotip je među bolesnicima uočen s učestalošću od 2,7 %, dok u kontroli nije uočen. Još su dva haplotipa pokazala statistički značajnu razliku u skupini bolesnika ($P<0,05$), HLA-02:01~B*08:01~03:01 i HLA-02:01~B*51:01~DRB1*04:02 dok ih u kontrolnoj skupini nije bilo. Haplotip HLA-01:01~B*08:01~DRB1*03:01 s učestalošću od 4,5% među bolesnicima i 2,8% u kontroli bio je najčešći u obje istraživane skupine. Četiri haplotipa uočena u skupini bolesnika HLA-02:01~B*39:01~DRB1*16:01, HLA-02:01~B*52:01~DRB1*15:02, HLA-03:01~B*35:03~DRB1*14:01:01g i HLA-24:03~B*18:01~DRB1*16:01 nisu uočena u kontrolnoj skupini. Razlika između dvije skupine bila je na granici statističke značajnosti ($P=0,0497$).

Tablica 15. Prikaz haplotipova[#] HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija) u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom (N=111) i zdravoj kontroli (N=190)

HLA-A*~B*~DRB1*	BOLESNICI S EN (N=111)		KONTROLA (N=190)		P
	n	HF	n	HF	
01:01~08:01~03:01	9,0	0,0405	10,9	0,0287	0,4835
02:01~08:01~03:01	5,0	0,0225	-	-	0,0066
02:01~18:01~11:04	4,7	0,0212	4,0	0,0105	0,3011
02:01~27:02~16:01	6,0	0,0270	-	-	0,0024
02:01~39:01~16:01	3,0	0,0135	-	-	0,0497
02:01~44:02:01g~16:01	4,8	0,0218	4,0	0,0105	0,3011
02:01~51:01~04:02	4,0	0,0180	-	-	0,0182
02:01~51:01~11:01	3,0	0,0135	7,5	0,0197	0,7541
02:01~52:01~15:02	3,0	0,0135	-	-	0,0497
03:01~07:02~15:01	4,0	0,0180	9,5	0,0250	0,5880
03:01~35:03~14:01:01g	3,0	0,0135	-	-	0,0497
11:01~35:01~01:01	3,0	0,0135	3,0	0,0079	0,6764
24:02~07:02~15:01	3,0	0,0135	5,3	0,0140	1,0000
24:03~18:01~16:01	3,0	0,0135	-	-	0,0497
26:01~38:01~04:02	5,0	0,0225	2,0	0,0053	0,0781

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n-broj uočenih haplotipova HLA-A~B~DRB1; HF - učestalost haplotipa HLA-A~B~DRB1; B*44:02:01g (B*44:02 ili B*44:27); DRB1*14:01:01g (DRB1*14:01 ili DRB1*14:54); # - u tablici su prikazani samo haplotipovi HLA-A~B~DRB1 uočeni $\geq 3x$ unutar skupine bolesnika

U tablici 16a. prikazani su svi aleli i haplotipi HLA koji su bili statistički značajno povišeni u skupini EN bolesnika u usporedbi s kontrolom. Za haplotip HLA-B*44~DRB1*16 uočena je statistički najznačajnija P vrijednost (P=0,0130) za razliku učestalosti između bolesničke i kontrolne skupine. S druge strane alel HLA-

DRB1*04:02 i haplotip HLA-B*38~DRB1*04 pokazali su približno isti omjer izgleda (OD=2,76 i OD=2,88).

Nasuprot rezultatima iz tablice 16a., aleli HLA koji su bili statistički značajno sniženi u skupinu EN bolesnika u usporedbi s kontrolom prikazani su u tablici 16b. Statistički najznačajniju razliku pokazao je alel HLA-A*01:01 koji je u bolesničkoj skupini bio približno dva puta manje prisutan nego među zdravim ispitanicima (7,6% naspram 14,2%; P=0,0109; OD=0,46; 95% CI=0,25-0,83). Više od dvostruko sniženu učestalost u skupini bolesnika pokazao je i alel HLA-B*57:01 (2,7% naspram 6,8%; P=0,0299; OR=0,36; 95%CI=0,14-0,91). Značajnu razliku u učestalosti između bolesnika s EN i zdravih ispitanika uočena je za alel HLA-B*27:05 (1,4% naspram 4,7%; P=0,0369; OD=0,27; 95%CI=0,08-0,92). Niti jedan haplotip HLA nije pokazao statistički značajnu sniženu učestalost među EN bolesnicima

Tablica 16a. Zbirni prikaz alela i haplotipova HLA koji su statistički značajno POVIŠENI u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom u usporedbi s kontrolom

HLA-			EN BOLESNICI (N=111)	KONTROLA (N=190)	P	OD (95% CI)
A*	B*	DRB1*	%	%		
		04:02	6,31	2,37	0,0225	2,76 (1,15-6,60)
	18	11	5,54	1,35	0,0286	10,80 (1,28-0,92)
	38	04	10,9	7,3	0,0344	2,88 (1,08-7,65)
	44	16	7,5	1,6	0,0130	7,30 (1,52-35,02)
02	18	11	7,9	3,0	0,0219	4,84 (1,26-18,65)
24	35	11	6,0	-	0,0321	23,47(1,31-420,82)
02:01	08:01	03:01	5,0	-	0,0444	19,68 (1,08-359,32)
02:01	27:02	16:01	6,0	-	0,0231	23,47 (1,31-420,82)

Kazalo: EN - endemska nefropatija; % - učestalost gena/alela/haplotipova HLA; OD - omjer izgleda; CI - interval pouzdanosti

Tablica 16b. Zbirni prikaz alela HLA koji su statistički značajno SNIŽENI u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom u usporedbi s kontrolom

HLA-			EN BOLESNICI	KONTROLA (N=190)		
A*	B*	DRB1*	%	%	P	OD (95% CI)
	01:01		7,66	14,21	0,0109	0,46 (0,25-0,83)
	27:05		1,35	4,74	0,0369	0,27 (0,008-0,92)
	57:01		2,70	6,84	0,0299	0,36 (0,14-0,91)

Kazalo: EN - endemska nefropatija; % - učestalost gena/alela/haplotipova HLA; OD - omjer izgleda; CI - interval pouzdanosti

5.2. RASPODJELA GENA, ALELA I HAPLOTIPOVA LOKUSA HLA-A, -B i -DRB1 UNUTAR PODSKUPINA BOLESNIKA S OBZIROM NA PRISUTNOST KARCINOMA UROTELA GORNJEGA UROTRAKTA

5.2.1. Raspodjela gena lokusa HLA-A, -B i -DRB1

Skupinu bolesnika s EN podijelili smo na dvije podskupine obziroma na prisutnost, odnosno odsutnost karcinoma urotela gornjega urotrakta (UUC) te analizirali učestalost gena, alela i haplotipova HLA.

Na lokusu HLA-A niti jedan od 14 gena HLA-A nije pokazao statistički značajnu razliku u zastupljenosti između dvije podskupine bolesnika (tablica 17).

U tablici 18 prikazane su učestalosti gena HLA-B među kojima je samo gen HLA-B*27

Tablica 17. Usporedba raspodjele gena lokusa HLA-A među EN bolesnicima s karcinomom urotela gornjega urotrakta (N=52) i EN bolesnika bez karcinoma urotela gornjega urotrakta (N=59)

HLA-A*	EN BOLESNICI S UUC (N=52)		EN BOLESNICI BEZ UUC (N=59)		P
	n	GF	n	GF	
01	8	0,0769	9	0,0763	1,0000
02	31	0,2981	37	0,3136	0,8842
03	10	0,0962	15	0,1271	0,5276
11	4	0,0385	8	0,0678	0,3863
23	4	0,0385	2	0,0170	0,4224
24	18	0,1731	15	0,1270	0,3514
25	3	0,0288	4	0,0339	1,0000
26	11	0,1058	8	0,0678	0,3445
29	1	0,0096	1	0,0085	1,0000
30	1	0,0096	2	0,0170	1,0000
31	4	0,0385	5	0,0424	1,0000
32	3	0,0289	8	0,0678	0,2253
33	1	0,0096	1	0,0085	1,0000
68	5	0,0481	3	0,0254	0,4778

Kazalo: EN - endemska nefropatija; UUC - karcinom urotela gornjega urotrakta; n - broj uočenih gena HLA-A; GF - učestalost gena HLA-A

Tablica 18. Usporedba raspodjele gena lokusa HLA-B među EN bolesnicima s karcinomom urotela gornjega urotrakta (N=52) i EN bolesnika bez karcinoma urotela gornjega urotrakta (N=59)

HLA-B*	EN BOLESNICI S UUC (N=52)		EN BOLESNICI BEZ UUC (N=59)		P
	n	GF	n	GF	
07	8	0,0769	8	0,0678	0,8014
08	9	0,0865	9	0,0763	0,8098
13	2	0,0192	5	0,0424	0,4523
14 (B64)	-	-	1	0,0085	1,0000
14 (B65)	2	0,0192	1	0,0085	0,6009
15 (B62)	2	0,0192	3	0,0254	1,0000
18	9	0,0865	12	0,1070	0,8195
27	8	0,0769	2	0,0170	0,0437
35	17	0,1635	22	0,1864	0,7251
37	1	0,0096	1	0,0085	1,0000
38	11	0,1058	5	0,0424	0,0753
39	3	0,0289	4	0,0339	1,0000
40 (B60)	1	0,0096	1	0,0085	1,0000
40 (B61)	3	0,0289	4	0,0339	1,0000
41	-	-	1	0,0085	1,0000
44	9	0,0865	11	0,0932	1,0000
47	-	-	1	0,0085	1,0000
48	1	0,0096	-	-	0,4685
49	1	0,0096	5	0,0424	0,2180
50	1	0,0096	1	0,0085	1,0000

51	8	0,0769	10	0,0846	1,0000
52	3	0,0289	1	0,0085	0,3428
53	1	0,0096	1	0,0085	1,0000
54	-	-	1	0,0085	1,0000
55	1	0,0096	1	0,0085	1,0000
56	-	-	4	0,0339	0,1246
57	3	0,0289	3	0,0254	1,0000

Kazalo: EN - endemska nefropatija; UUC - karcinom urotela gornjega urotrakta; n - broj uočenih gena HLA-B; GF - učestalost gena HLA-B () - serološki ekvivalent

bio statistički značajno ($P=0,0437$) češće prisutan među bolesnicima s UUC-om (7,7%) u usporedbi s bolesnicima bez UUC-a (1,7%). Gen HLA-B*38 unatoč dvostruko većoj zastupljenosti u skupini EN bolesnika s UUC-om (10,6%) u usporedbi s bolesnicima bez UUC-a (4,2%) nije dosegnuo statističku značajnost. Ostali geni HLA-B bili su podjednako zastupljeni u obje podskupine bolesnika s EN-om.

Na lokusu HLA-DRB1 niti jedan gen nije pokazao razliku u zastupljenosti između dvije podskupine EN bolesnika (tablica 19).

Tablica 19. Usporedba raspodjele gena lokusa HLA-DRB1 među EN bolesnicima s karcinomom urotela gornjega urotrakta (N=52) i EN bolesnika bez karcinoma urotela gornjega urotrakta (N=59)

HLA-DRB1*	EN BOLESNICI S UUC (N=52)		EN BOLESNICI BEZ UUC (N=59)		P
	n	GF	n	GF	
01	10	0,0962	13	0,1102	0,8296
03	10	0,0962	14	0,1186	0,6679
04	13	0,1250	11	0,0932	0,5185
07	8	0,0769	11	0,0932	0,8110
08	1	0,0096	2	0,0170	1,0000
10	-	-	2	0,0170	0,4997
11	21	0,2019	19	0,1610	0,4556
12	2	0,0192	2	0,0170	1,0000
13	10	0,0962	12	0,1070	1,0000
14	3	0,0289	4	0,0339	1,0000
15	11	0,1058	10	0,0848	0,6501
16	15	0,1442	18	0,1525	1,0000

Kazalo: EN - endemska nefropatija; UUC - karcinom urotela gornjega urotrakta; n - broj uočenih gena HLA-DRB1; GF - učestalost gena HLA-DRB1

5.2.2. Raspodjela alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1

Analiza raspodjele alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1 među bolesnicima obzirom na prisustvo/odsustvo UUC-a prikazana je u tablicama 20-22. Niti jedan alel istraživanih lokusa HLA nije pokazao razliku u zastupljenosti između dvije podskupine EN bolesnika.

Tablica 20. Usporedba raspodjele alela lokusa HLA-A među EN bolesnicima s karcinomom urotela gornjega urotrakta (N=52) i EN bolesnika bez karcinoma urotela gornjega urotrakta (N=59)

HLA-A*	EN BOLESNICI S UUC (N=52)		EN BOLESNICI BEZ UUC (N=59)		P
	n	AF	n	AF	
01:01	8	0,0769	9	0,0763	1,0000
02:01	29	0,2789	37	0,3136	0,6592
02:05	1	0,0096	-	-	0,4685
02:22	1	0,0096	-	-	0,4685
03:01	10	0,0962	15	0,1271	0,5276
11:01	4	0,0386	8	0,0678	0,3863
23:01	4	0,0385	2	0,0170	0,4224
24:02	17	0,1635	12	0,1017	0,2310
24:03	-	-	3	0,0254	0,2469
24:07	1	0,0096	-	-	0,4685
25:01	3	0,0289	4	0,0339	1,0000
26:01	11	0,1058	8	0,0678	0,3445
29:02	1	0,0096	1	0,0085	1,0000
30:01	1	0,0096	2	0,0170	1,0000
31:01	2	0,0192	5	0,0424	0,4523
31:02	2	0,0192	-	-	0,2183
32:01	3	0,0289	8	0,0678	0,2253
33:01	1	0,0096	1	0,0085	1,0000
68:01	4	0,0385	2	0,0170	0,4224
68:02	1	0,0096	1	0,0085	1,0000

Kazalo: EN - endemska nefropatija; UUC - karcinom urotela gornjega urotrakta; n - broj uočenih alela HLA-A; AF - učestalost alela HLA-A

Tablica 21. Usporedba raspodjele alela lokusa HLA-B među EN bolesnicima s karcinomom urotela gornjega urotrakta (N=52) i EN bolesnika bez karcinoma urotela gornjega urotrakta (N=59)

HLA-B*	EN BOLESNICI S UUC (N=52)		EN BOLESNICI BEZ UUC (N=59)		P
	n	AF	n	AF	
07:02	8	0,0769	8	0,0678	0,8014
08:01	9	0,0865	9	0,0763	0,8098
13:02	2	0,0192	5	0,0424	0,4523
14:01	-	-	1	0,0085	1,0000
14:02	2	0,0192	1	0,0085	0,6009
15:01	1	0,0096	3	0,0254	0,6246
15:09	1	0,0096	-	-	0,4685
18:01	9	0,0865	12	0,1017	0,8195
27:02	5	0,0481	2	0,0170	0,2568
27:05	3	0,0289	-	-	0,1012
35:01	5	0,0481	14	0,1186	0,0906
35:02	3	0,0289	1	0,0085	0,3428
35:03	9	0,0865	6	0,0509	0,4225
35:08	-	-	1	0,0085	1,0000
37:01	1	0,0096	1	0,0085	1,0000
38:01	11	0,1058	5	0,0424	0,0753
39:01	1	0,0096	4	0,0339	0,3744
39:03	1	0,0096	-	-	0,4685
39:06	1	0,0096	-	-	0,4685
40:01	1	0,0096	1	0,0085	1,0000

40:02	3	0,0289	4	0,0339	1,0000
41:01	-	-	1	0,0085	1,0000
44:02:01g	8	0,0769	10	0,0845	1,0000
44:03	1	0,0096	1	0,0085	1,0000
47:01	-	-	1	0,0085	1,0000
48:01	1	0,0096	-	-	0,4685
49:01	1	0,0096	5	0,0424	0,2180
50:01	1	0,0096	1	0,0085	1,0000
51:01	8	0,0769	10	0,0848	1,000
52:01	3	0,0289	1	0,0085	0,3428
53:01	1	0,0096	1	0,0085	1,0000
54:01	-	-	1	0,0085	1,0000
55:01	1	0,0096	1	0,0085	1,0000
56:01	-	-	4	0,0339	0,1246
57:01	3	0,0289	3	0,0254	1,0000

Kazalo: EN - endemska nefropatija; UUC - karcinom urotela gornjega urotrakta; n - broj uočenih alela HLA-B; AF - učestalost alela HLA-B; B*44:02:01g (B*44:02 ili B*44:27)

Tablica 22. Usporedba raspodjele alela lokusa HLA-DRB1 među EN bolesnicima s karcinomom urotela gornjega urotrakta (N=52) i EN bolesnika bez karcinoma urotela gornjega urotrakta (N=59)

HLA-DRB1*	EN BOLESNICI S UUC (N=52)		EN BOLESNICI BEZ UUC (N=59)		P
	n	AF	n	AF	
01:01	7	0,0673	13	0,1102	0,3489
01:02	2	0,0192	-	-	0,2183
01:03	1	0,0096	-	-	0,4685
03:10	10	0,0962	14	0,1186	0,6679
04:01	1	0,0096	5	0,0424	0,2180
04:02	8	0,0769	6	0,0509	0,5817
04:04	3	0,0289	-	-	0,1012
04:05	1	0,0096	-	-	0,4685
07:01	8	0,0769	11	0,0932	0,8110
08:01	1	0,0096	2	0,0170	1,0000
10:01	-	-	2	0,0170	0,4997
11:01	14	0,1346	7	0,0593	0,0673
11:03	-	-	1	0,0085	1,0000
11:04	6	0,0577	10	0,0846	0,6040
11:12	1	0,0096	1	0,0085	1,0000
12:01	2	0,0192	2	0,0170	1,0000
13:01	4	0,0385	10	0,0848	0,1780
13:02	4	0,0385	1	0,0085	0,1885
13:03	2	0,0192	1	0,0085	0,6009

14:01:01g	3	0,0289	3	0,0254	1,0000
14:05	-	-	1	0,0085	1,0000
15:01	8	0,0769	9	0,0763	1,0000
15:02	3	0,0289	1	0,0085	0,3428
16:01	15	0,1442	16	0,1356	1,0000
16:02	-	-	1	0,0085	1,0000
16:03	-	-	1	0,0085	1,0000

Kazalo: EN - endemska nefropatija; UUC - karcinom urotela gornjega urotrakta; n - broj uočenih alela HLA-DRB1; AF - učestalost alela HLA-DRB1; DRB1*14:01:01g (DRB1*14:01 ili DRB1*14:54)

5.2.3. Raspodjela haplotipova HLA

5.2.3.1. Raspodjela haplotipova HLA-B~DRB1 (niska rezolucija)

Raspodjela haplotipova HLA-B~DRB1 (niska rezolucija) uočenih $\geq 3x$ unutar pojedine podskupine EN bolesnika prikazana je u tablici 23. Dva su haplotipa pokazala statistički značajnu razliku u učestalosti. Haplotip HLA-B*35~DRB1*01 statistički značajno češće je bio prisutan među bolesnicima bez UUC-a (6,7%; $P < 0,01$), haplotip nije imao niti jedan

Tablica 23. Usporedba raspodjele haplotipova[#] HLA-B~DRB1 (niska rezolucija) među EN bolesnicima s karcinomom urotela gornjega urotrakta (N=52) i EN bolesnika bez karcinoma urotela gornjega urotrakta (N=59)

HLA-B*~DRB1*	EN BOLESNICI S UUC (N=52)		EN BOLESNICI BEZ UUC (N=59)		P
	n	HF	n	HF	
07~13	-	-	3,0	0,0254	0,2496
07~15	5,0	0,0481	2,0	0,0170	0,2568
08~03	6,8	0,0652	8,0	0,0678	1,0000
18~11	6,0	0,0577	6,5	0,0547	1,0000
18~16	-	-	3,4	0,0292	0,2496
27~16	4,0	0,0385	2,0	0,0170	0,4224
35~01	-	-	7,9	0,0669	0,0077
35~03	-	-	3,0	0,0254	0,2496
35~04	4,0	0,0385	-	-	0,0467
35~11	4,7	0,0449	3,5	0,0301	0,7373
35~15	3,0	0,0289	1,0	0,0085	0,3427
38~04	8,0	0,0769	3,0	0,0254	0,1193
39~16	3,0	0,0289	3,0	0,0254	1,0000
40(B61)~11	3,0	0,0289	-	-	0,1012
44~11	2,1	0,0120	4,0	0,0339	0,6870
44~16	5,9	0,0570	3,0	0,0254	0,3109
51~11	3,0	0,0289	3,0	0,0254	1,0000
51~15	-	-	3,0	0,0254	0,2496

Kazalo: EN - endemska nefropatija; UUC - karcinom urotela gornjega urotrakta; n - broj uočenih haplotipova HLA-B~DRB1; HF - učestalost haplotipa HLA-B~DRB1; () - serološki ekvivalent; # - prikazani su samo haplotipovi HLA-B~DRB1 uočeni $\geq 3x$ unutar pojedine podkupine bolesnika

bolesnik s UUC-om. Istovremeno haplotip HLA-B*35~DRB1*04 s frekvencijom od 3,9% među bolesnicima s UUC-om dostigao je statističku značajnost u usporedbi s bolesnicima bez UUC-a među kojima nije uočen.

5.2.3.2. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija)

Analiza raspodjele haplotipova HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija) uočenih $\geq 3x$ među EN bolesnicima s obzirom na UUC prikazana je u tablici 24. U skupini bolesnika s UUC-om uočeno je osam haplotipa od kojih tri haplotipa nisu uočena u skupini bolesnika bez UUC-a, a najzastupljeniji iz te skupine haplotip HLA-A*26~B*38~DRB1*04 (5,8%) je pokazao statistički značajno ($P=0,0098$) povišenu učestalost među EN bolesnicima s UUC-om.

Tablica 24. Usporedba raspodjela haplotipova[#] HLA-A~B~DRB1 među EN bolesnicima s karcinomom urotela gornjega urotrakta (N=52) i EN bolesnika bez karcinoma urotela gornjega urotrakta (N=59)

HLA-A*~B*~DRB1*	EN BOLESNICI S UUC (N=52)		EN BOLESNICI BEZ UUC (N=59)		P
	n	HF	n	HF	
01~08~03	3,0	0,0290	6,0	0,0509	0,5068
02~18~11	3,0	0,0290	4,0	0,0339	1,0000
02~35~16	5,0	0,0481	2,0	0,0170	0,2568
02~39~16	-	-	3,0	0,0254	0,6009
02~40(B61)~11	3,0	0,0290	1,0	0,0085	0,3428
02~44~16	4,0	0,0385	2,0	0,0170	0,4224
03~07~13	-	-	4,0	0,0339	0,1246
03~07~15	3,0	0,0290	-	-	0,1012
03~35~01	-	-	3,0	0,0254	0,6009
24~18~16	-	-	3,0	0,0254	0,6009

24~35~04	3,0	0,0290	-	-	0,1012
24~35~11	-	-	3,0	0,0254	0,6009
26~38~04	6,0	0,0577	-	-	0,0098

Kazalo: EN - endemska nefropatija; UUC - karcinom urotela gornjega urotrakta; n - broj uočenih haplotipova HLA-A~B~DRB1; HF - učestalost haplotipa HLA-A~B~DRB1; () - serološki ekvivalent; # - u tablici su prikazani samo haplotipovi HLA-A~B~DRB1 uočeni $\geq 3x$ unutar pojedine podskupine bolesnika

Haplotip HLA-A*03~B*07~DRB1*13 u skupini EN bolesnika bez UUC-a pojavio se u 3,3% ispitanika dok u skupini bolesnika s UUC-om nije bio prisutan.

5.2.3.3. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija)

Usporedba raspodjele haplotipova HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija) uočenih $\geq 3x$ pokazala je statistički značajnu razliku u skupini bolesnika s UUC-om za haplotip HLA-26:01~B*38:01~DRB1*04:02 koji u skupini bolesnika bez UUC-a nije otkriven (3,8% naspram 0%, $P=0,0467$).

Tablica 25. Usporedba raspodjele haplotipova[#] HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija) među EN bolesnicima s karcinomom urotela gornjega urotrakta (N=52) i EN bolesnika bez karcinoma urotela gornjega urotrakta (N=59)

HLA-A*~B*~DRB1*	EN BOLESNICI S UUC (N=52)		EN BOLESNICI BEZ UUC (N=59)		P
	n	HF	n	HF	
01:01~08:01~03:01	3,0	0,0289	6,0	0,0509	0,5069
02:01~18:01~11:01	-	-	3,0	0,0254	0,2496
02:01~18:01~11:04	3,0	0,0289	1,0	0,0085	0,3428
02:01~35:03~16:01	4,0	0,0385	1,0	0,0085	0,1885
02:01~39:01~16:01	-	-	3,0	0,0254	0,2496
02:01~44:02:01g~16:01	3,0	0,0289	3,0	0,0254	1,0000
03:01~07:02~13:01	-	-	3,0	0,0254	0,2496

03:01~07:02~15:01	3,0	0,0289	-	-	0,1012
11:01~35:01~01:01	-	-	3,0	0,0254	0,2496
24:03~18:01~16:01	-	-	3,0	0,0254	0,2496
26:01~38:01~04:02	4,0	0,0385	-	-	0,0467

Kazalo: EN - endemska nefropatija; UUC - karcinom urotela gornjega urotakta; n-broj uočenih haplotipova HLA-A~B~DRB1; HF - učestalost haplotipa HLA-A~B~DRB1; B*44:02:01g (B*44:02 ili B*44:27); # - u tablici su prikazani samo haplotipovi HLA-A~B~DRB1 uočeni $\geq 3x$ unutar pojedine podskupine bolesnika;

U tablici 26. prikazani su svi aleli i haplotipovi HLA koji su bili statistički značajno povišeni među EN bolesnicima s UUC-om u usporedbi s kontrolom. Najveća statistička značajnost uočena je za alel HLA-DRB1*04:02 ($P=0,0117$; $OD=3,65$; $98\% CI=1,33-10,02$), ali i za haplotip HLA koji je tvorio s alelom HLA-A*26:01 i alelom HLA-B*38:01 ($P=0,0195$; $OD=7,83$; $95\% CI=1,39-44,04$).

Niti jedan gen, alel ili haplotip HLA nije pokazao statistički značajno sniženu učestalost među EN bolesnicima s UUC-om u usporedbi s kontrolom, čak ni približno dvostruko niža učestalost alela HLA-A*01:01 među EN bolesnicima s UUC-om (7,69%) u odnosu na kontrolu (14,21%) nije dostigla statističku značajnost ($P=0,0562$; $OR=0,45$; $95\% CI=0,20-1,02$).

Tablica 26. Zbirni prikaz alela i haplotipova HLA koji su statistički značajno POVIŠENI u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom i karcinomom urotela gornjega urotrakta (N=52) u usporedbi s kontrolom (N=190)

HLA-			EN BOLESNICI S UUC (N=52)	KONTROLA (N=190)		
A*	B*	DRB1*	%	%	P	OD (95% CI)
		04:02	7,69	2,37	0,0117	3,65 (1,33-10,02)
	18	11	5,77	1,35	0,0121	4,83 (1,41-16,51)
24	35	04	2,90	-	0,0303	26,94 (1,37-530,22)
26	38	04	5,77	1,58	0,0142	4,38 (1,35-14,29)
26:01	38:01	04:02	3,85	0,53	0,0195	7,83 (1,39-44,04)

Kazalo: EN - endemska nefropatija; UUC - karcinom urotela gornjega urotrakta; % - učestalost gena/alela/haplotipa HLA; OD - omjer izgleda; CI-interval pouzdanosti

Analiza učestalosti gena/alela/haplotipova HLA između podskupine EN bolesnika bez UUC-a i zdravih ispitanika pokazala je samo razliku za haplotip HLA-B*18~DRB1*11 koji je bio statistički značajno češće prisutan među bolesnicima (P=0,0081; OD=4,98; 95% CI=1,52-16,34). Istovremeno niti jedan gen, alel ili haplotip HLA nije bio statistički značajno snižen u skupini EN bolesnika s UUC-om.

5.3. RASPODJELA GENA, ALELA I HAPLOTIPOVA LOKUSA HLA-A, -B i -DRB1 UNUTAR PODSKUPINA BOLESNIKA S ENDEMSKOM NEFROPATIJOM S OBZIROM NA ŽIVOTNU DOB POJAVE BOLESTI (PRIJE I NAKON 65. g. ŽIVOTA)

5.3.1. Raspodjela gena lokusa HLA-A, -B i -DRB1

Bolesnici su analizirani i obzirom na dob pojave bolesti te su podijeljeni u dvije podskupine, bolesnike kod kojih se bolest pojavila prije 65. godine života i bolesnike kod kojih se bolest pojavila poslije 65. godine života (tablica 27). Gen HLA-A*23 uočen je u podskupini bolesnika starijih od 65 godina (4,6%) uz statistički značajnu razliku ($P=0,0430$) spram podskupine mlađe od 65 godina u kojoj nije bio uočen. Učestalosti gena lokusa HLA-B i -DRB1 u obje prikazane podskupine EN bolesnika nisu dosegnule statistički značajne razlike.

Tablica 27. Prikaz raspodjele gena[#] lokusa HLA-A, -B i -DRB1 među EN bolesnicima s obzirom na dob pojave bolesti prije i nakon 65. godine života (<65 g. N=46; ≥65 g. N=65)

HLA-A*	EN BOLESNICI <65 g. (N=46)		EN BOLESNICI ≥65 g. (N=65)		P
	n	GF	n	GF	
03	8	0,0870	17	0,1308	0,3906
23	-	-	6	0,0462	0,0430
24	14	0,1522	19	0,1462	1,0000
25	2	0,0217	5	0,0385	0,7024
26	9	0,0978	10	0,0769	0,6309
68	5	0,0544	3	0,0231	0,2807
HLA-B*					
07	5	0,0544	11	0,0846	0,4416
08	10	0,1087	8	0,0615	0,2211
14(B65)	3	0,0326	-	-	0,0698

15(B62)	1	0,0109	4	0,0308	0,4060
40(B61)	4	0,0435	3	0,0231	0,4523
44	6	0,0652	14	0,1077	0,3451
51	9	0,0978	9	0,0692	0,4635
53	2	0,0217	-	-	0,1706
56	-	-	4	0,0308	0,1437
HLA-DRB1*					
03	14	0,1523	10	0,0769	0,0832
04	12	0,1304	12	0,0923	0,3875
07	5	0,0544	14	0,1077	0,2239
11	18	0,1957	22	0,1692	0,722
12	-	-	4	0,0308	0,1437
14	4	0,0435	3	0,02308	0,4523
16	11	0,1196	22	0,1692	0,3431

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih gena; GF - učestalost gena HLA; () - serološki ekvivalent; # - u tablici su prikazani samo geni HLA za koje je uočena razlika $\geq 2\%$ između dvije podskupine bolesnika

5.3.1. Raspodjela alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1

U tablici 28 prikazani su rezultati raspodjele alela HLA u dvije podskupine bolesnika s EN podijeljene na životnu dob pojave bolesti (prije i poslije 65. godine života), prikazani su samo aleli čija je razlika učestalosti između podskupina bila $\geq 2\%$. Statistički značajno povišenu zastupljenost među bolesnicima kod kojih se bolest pojavila nakon 65.godine pokazao je alel HLA-A*23:01 P=0,0430). Nasuprot tome aleli lokusa HLA-B*14:02 i -B*27:05, uočeni su samo u podskupini mlađoj od 65 godina ali ta razlika nije dosegla razinu statističke značajnosti.

Tablica 28. Prikaz raspodjele alela[#] lokusa HLA-A, -B i -DRB1 među EN bolesnicima s obzirom na dob pojave bolesti prije i nakon 65. godine života (<65 g. N=46; ≥65 g. N=65)

HLA-A*	EN BOLESNICI <65. g. (N=46)		EN BOLESNICI ≥65 g. (N=65)		P
	n	AF	n	AF	
03:01	8	0,0867	17	0,1308	0,3906
23:01	-	-	6	0,0462	0,0430
26:01	9	0,0978	10	0,0769	0,6309
31:01	-	-	3	0,0231	0,2687
33:01	2	0,0217	-	-	0,1706
68:02	2	0,0217	-	-	0,1706
HLA-B*					
07:02	5	0,0544	11	0,085	0,4416
14:02	3	0,0326	-	-	0,0698
27:05	3	0,0326	-	-	0,0698
35:01	9	0,0978	10	0,0769	0,6309
35:03	4	0,0435	11	0,0846	0,2849
40:02	4	0,0435	3	0,0231	0,4523
44:02:01g	6	0,0652	12	0,0923	0,6192
51:01	9	0,9780	9	0,0692	0,4635
53:01	2	0,0217	-	-	0,1706
56:01	-	-	4	0,0231	0,1437
HLA-DRB1*					
01:01	7	0,0761	13	0,1000	0,6380
03:01	14	0,1522	10	0,0769	0,0832

04:02	8	0,0870	6	0,0462	0,2664
07:01	5	0,0544	14	0,1077	0,2239
11:01	7	0,0761	14	0,1077	0,4916
11:04	9	0,0978	7	0,0539	0,2922
12:01	-	-	4	0,0308	0,1437
13:01	7	0,0761	7	0,0539	0,5796
13:03	-	-	3	0,0231	0,2687
16:01	10	0,1615	10	0,1087	0,4768

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih alela; AF - učestalost alela HLA; B*44:02:01g (B*44:02 ili B*44:27); # - u tablici su prikazani samo aleli HLA za koje je uočena razlika $\geq 2\%$ između dvije podskupine bolesnika

5.3.3. Raspodjela haplotipova HLA

5.3.3.1. Raspodjela haplotipova HLA-B~DRB1 (niska rezolucija)

Uspoređujući raspodjelu haplotipova lokusa HLA-B~DRB1 (niska rezolucija) između podskupina bolesnika s obzirom na dob pojave bolesti (<65 i ≥ 65 godina života), dva su haplotipa HLA-B*35~DRB1*01 i HLA-B*51~DRB1*13 pokazala statistički značajnu razliku ($P < 0,05$), zastupljeni su bili samo u podskupini bolesnika mlađih od 65 godina (tablica 29). Nasuprot tome, haplotip HLA-B*44~DRB1*16 uz uočenu statistički značajnu razliku ($P < 0,05$), nađen je samo u podskupini bolesnika starijih od 65 godina.

Tablica 29. Prikaz raspodjele haplotipova[#] lokusa HLA-B~DRB1 (niska rezolucija) među EN bolesnicima s obzirom na dob pojave bolesti prije i nakon 65. godine života (<65 g. N=46; ≥65 g. N=65)

HLA-B*~DRB1*	EN BOLESNICI <65 g. (N=46)		EN BOLESNICI ≥65 g. (N=65)		P
	n	HF	n	HF	
07~07	-	-	3,0	0,0231	0,2657
07~15	-	-	4,8	0,0367	0,0781
08~03	9,0	0,0978	6,0	0,0462	0,1750
13~07	-	-	4,0	0,0308	0,1437
15 (B62)~13	-	-	4,0	0,0308	0,1437
18~01	-	-	3,0	0,0231	0,2657
18~11	6,0	0,0652	5,8	0,0448	0,5597
27~16	2,0	0,0217	5,0	0,0385	0,7024
35~01	4,0	0,0435	-	-	0,0284
35~04	2,0	0,0217	2,8	0,0213	1,0000
35~11	6,0	0,0652	2,6	0,0198	0,1675
35~14	-	-	3,0	0,0231	0,2657
35~15	-	-	3,2	0,0249	0,2657
35~16	-	-	3,4	0,0264	0,2657
38~04	5,0	0,0544	6,0	0,0462	0,7652
39~16	2,0	0,0217	4,0	0,0308	1,0000
40 (B61)~11	-	-	3,0	0,0231	0,2657
44~11	2,5	0,0272	3,6	0,0308	1,0000
44~16	-	-	6,4	0,0492	0,0430
51~01	-	-	4,0	0,0308	0,1437
51~11	2,5	0,0272	4,0	0,0308	1,0000
51~13	4,0	0,0435	-	-	0,0284

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih haplotipova HLA-B~DRB1; HF - učestalost haplotipa HLA-B~DRB1; () - serološki ekvivalent; # - u tablici su prikazani samo haplotipovi uočeni ≥3x unutar pojedine podskupine bolesnika

5.3.3.2. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija)

U prikazu raspodjele haplotipova lokusa HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija) među podskupinom bolesnika mlađih do 65 i starijih od 65 godina s obzirom na dob pojave bolesti uočeno je 14 haplotipova HLA-A~B~DRB1 od kojih je haplotip HLA-A*24~B*35~DRB1*11 pokazao statistički značajnu razliku ($P < 0,05$) u podskupini bolesnika mlađih od 65 godina. Haplotip HLA-A*03~B*35~DRB1*16 uočen je samo u podskupini bolesnika starijih od 65 godina dok ga u uspoređenoj podskupini nije bilo, međutim ta razlika nije dosegla razinu statističke značajnosti (tablica 30).

Tablica 30. Prikaz raspodjele haplotipova[#] lokusa HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija) među EN bolesnicima s obzirom na dob pojave bolesti prije i nakon 65. godine života (<65 g. N=46; ≥65 g. N=65)

HLA-A*~B*~DRB1*	EN BOLESNICI <65 g. (N=46)		EN BOLESNICI ≥65 g. (N=65)		P
	n	HF	n	HF	
01~08~03	6,0	0,0652	3,0	0,0231	0,1675
02~08~03	-	-	3,0	0,0231	0,2687
02~18~11	4,0	0,0435	4,0	0,0308	0,7203
02~35~16	3,0	0,0326	-	-	0,0698
02~39~16	1,0	0,0109	4,0	0,0308	0,4060
02~44~16	2,0	0,0217	4,5	0,0346	0,7024
02~51~01	-	-	3,0	0,0231	0,2687
02~51~04	3,0	0,0326	-	-	0,0698
03~07~13	-	-	3,0	0,0231	0,2687
03~07~15	-	-	4,0	0,0308	0,1437
03~35~16	-	-	5,0	0,0385	0,0781
24~13~07	-	-	3,0	0,0231	0,2687
24~35~11	4,0	0,0435	-	-	0,0284
26~38~04	2,0	0,0217	5,0	0,3850	0,7024

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih haplotipova HLA-A~B~DRB1; HF - učestalost haplotipa HLA-A~B~DRB1; # - u tablici su prikazani samo haplotipovi uočeni ≥3x unutar pojedine podskupine bolesnika

5.3.3.3. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija)

U tablici 31 prikazane su učestalosti haplotipova lokusa HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija) među podskupinama bolesnika s obzirom na dob pojave bolesti. Statistički značajnu razliku u usporedbi učestalosti između dvije podskupine bolesnika nije dosegno niti jedan od prikazanih haplotipa HLA-A~B~DRB1.

Tablica 31. Prikaz raspodjele haplotipova[#] lokusa HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija) među EN bolesnicima s obzirom na dob pojave bolesti prije i nakon 65. godine života (<65 g. N=46; ≥65 g. N=65)

HLA-A*~B*~DRB1*	EN BOLESNICI <65 g. (N=46)		EN BOLESNICI ≥65 g. (N=65)		P
	n	HF	n	HF	
01:01~08:01~03:01	6,0	0,0652	3,0	0,0231	0,1675
02:01~08:01~03:01	2,0	0,0217	3,0	0,0231	1,000
02:01~18:01~11:01	3,0	0,0326	-	-	0,0698
02:01~18:01~11:04	-	-	2,9	0,0223	0,2687
02:01~35:03~16:01	3,0	0,0326	-	-	0,0698
02:01~27:02~16:01	-	-	4,0	0,0308	0,1427
02:01~44:02:01g~16:01	2,0	0,0217	3,9	0,0300	1,000
02:01~51:01~01:01	-	-	3,0	0,0231	0,2687
02:01~51:01~04:02	3,0	0,0326	-	-	0,0698
03:01~07:02~15:01	-	-	4,0	0,0308	0,1437
03:01~35:03~14:01:01g	-	-	3,0	0,0231	0,2687
24:02~13:02~07:01	-	-	3,0	0,0231	0,2687
26:01~38:01~04:02	1	0,0109	4,0	0,0308	0,4060

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih haplotipova HLA-A~B~DRB1; HF - učestalost haplotipa HLA-A~B~DRB1; B*44:02:01g (B*44:02 ili B*44:27); DRB1*14:01:01g (DRB1*14:01 ili DRB1*14:54); # - u tablici su prikazani samo haplotipovi uočeni ≥3x unutar pojedine podskupine bolesnika

U tablici 32. prikazani su svi aleli i haplotipovi HLA koji su bili statistički značajno povišeni u skupini bolesnika s EN-om kod kojih se bolest pojavila prije 65. godine života naspram kontrole. Alel HLA-DRB1*04:02 s učestalošću od 8,7% pokazao je statistički najveću razliku ($P=0,0053$). Niti jedan gen, alel ili haplotip HLA nije pokazao statistički značajno sniženu učestalost među EN bolesnicima kod kojih se bolest pojavila prije 65. godine života u usporedbi s kontrolom.

Tablica 32. Zbirni prikaz alela i haplotipova HLA koji su statistički značajno POVIŠENI u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom kod kojih se bolest pojavila <65 godine života (N=46) u usporedbi s kontrolnom skupinom (N=190)

HLA-			EN BOLESNICI <65 g. (N=46)	KONTROLA (N=190)	P	OD (95% CI)
A*	B*	DRB1*	%	%		
		04:02	8,70	2,37	0,0053	4,23 (1,54-11,68)
	18	11	6,52	1,35	0,0065	5,55 (1,61-19,08)
	51	13	4,35	0,83	0,0408	4,43 (1,06-18,43)
02	18	11	4,35	0,79	0,0229	5,94 (1,28-27,52)
24	35	11	4,35	-	0,0137	40,34 (2,13-763,59)
02:01	18:01	11:01	3,25	-	0,0244	30,66 (1,55-604,32)

Kazalo: EN - endemska nefropatija; % - učestalost gena/alela/haplotipova HLA; OD - omjer izgleda; CI - interval pouzdanosti

Aleli i haplotipovi HLA koji su bili statistički značajno povišeni u skupini bolesnika s EN-om kod kojih se bolest javila nakon 65. godine života u usporedbi s kontrolom prikazani su u tablici 33. Haplotip HLA-B*44~DRB1*16 s učestalošću od 4,9% pokazao je statistički najveću razliku u usporedbi s kontrolom ($P=0,0029$; OD=11,34 95% CI=2,29-56,13).

Niti jedan gen, alel ili haplotip HLA među EN bolesnicima kod kojih se bolest pojavila nakon 65. godine života u usporedbi s kontrolom nije pokazao statistički značajno sniženu razliku, uključujući i dvostruko niža učestalost alela HLA-B*57:01 (2,31%) naspram kontrole (6,84%).

Tablica 33. Zbirni prikaz gena/alela/haplotipova HLA koji su statistički značajno POVIŠENI u skupini bolesnika s endemskom nefropatijom kod kojih se bolest pojavila \geq 65 godine života (N=65) u usporedbi s kontrolnom skupinom (N=190)

HLA-			EN BOLESNICI	KONTROLA	P	OD (95% CI)
A*	B*	DRB1*	\geq 65 g. (N=65) %	(N=190) %		
	18	11	4,48	1,35	0,0336	3,76 (1,11-12,78)
	44	16	4,92	1,30	0,0029	11,34 (2,29-56,13)
03	35	16	3,85	-	0,0169	34,64 (1,89-635,51)
02:01	27:02	16:01	3,08	-	0,0263	27,88 (1,48-525,18)

Kazalo: EN - endemska nefropatija; % - učestalost gena/alela/haplotipa HLA; OD - omjer izgleda; CI - interval pouzdanosti

5.4. RASPODJELA GENA ALELA I HAPLOTIPOVA LOKUSA HLA-A, -B i -DRB1 UNUTAR PODSKUPINA BOLESNIKA S ENDEMSKOM NEFROPATIJOM S OBZIROM NA PREŽIVLJENJE (MANJE ILI VIŠE OD 5 GODINA)

5.4.1. Raspodjela gena lokusa HLA-A, -B i -DRB1

Prema prikazu raspodjele gena lokusa HLA-A, -B i -DRB1 (tablica 34), među podskupinom bolesnika kod kojih je preživljenje od postavljanja dijagnoze bilo kraće ili duže od pet godina uočena je statistički značajno ($P=0,0098$) veća

učestalost za gen HLA-A*02 u podskupini s preživljenjem manjim od pet godina (43,8%) u usporedbi s podskupinom s preživljenjem dužim od pet godina (25,3%). Treba napomenuti da su u tablici 35 prikazani samo oni geni HLA-A, -B i -DRB1 za koje je razlika u učestalosti između dvije podskupine bolesnika iznosila $\geq 2,0\%$. Gen HLA-A*32 (7%), u podskupini bolesnika s preživljenjem većim od pet godina pokazao je statistički značajnu povišenu učestalost ($P=0,0363$) u odnosu na podskupinu bolesnika s preživljenjem manjim od 5 godina (0%).

Tablica 34. Prikaz raspodjele gena[#] lokusa HLA-A, -B i -DRB1 među EN bolesnicima s obzirom na preživljenje <5 godina (N=32) i ≥ 5 godina (N=79)

HLA-A*	EN BOLESNICI <5 g. (N=32)		EN BOLESNICI ≥ 5 g. (N=79)		P
	n	GF	n	GF	
01	6	0,0938	11	0,0696	0,5806
02	28	0,4375	40	0,2532	0,0098
03	6	0,0938	19	0,1203	0,8029
24	8	0,1250	25	0,1583	0,8213
25	1	0,0156	6	0,0378	0,6762
32	-	-	11	0,0696	0,0363
HLA-B*					
13	1	0,0156	6	0,0380	0,6762
18	4	0,0625	17	0,1076	0,4477
35	9	0,1406	30	0,1899	0,4470
38	6	0,0938	10	0,0633	0,4058
39	3	0,0469	4	0,0253	0,4141
50	2	0,0313	-	-	0,0822
51	7	0,1094	11	0,0696	0,4149
61	3	0,0469	4	0,0253	0,4141
HLA-DRB1*					
01	4	0,0625	19	0,1203	0,2338
03	5	0,0781	19	0,1203	0,4764
04	9	0,1406	15	0,0949	0,3439

11	13	0,2031	27	0,1709	0,5680
13	9	0,1406	13	0,0823	0,2166
15	5	0,0781	16	0,1013	0,8007

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih gena; GF - učestalost gena HLA; # - u tablici su prikazani samo geni HLA za koje je uočena razlika $\geq 2\%$ između dvije podskupine bolesnika

5.4.2. Raspodjela alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1

U raspodjeli alela lokusa HLA-A, -B i -DRB1 među podskupinom bolesnika kod kojih je preživljenje od postavljanja dijagnoze bilo manje ili više od pet godina uočena je statistički značajno ($P < 0,05$) veća učestalost za alel HLA-A*02:01 u podskupini s preživljenjem kraćim od pet godina (41%) u usporedbi s podskupinom bolesnika koji su preživljeli duže od pet godina (25,3%). S druge strane, alel HLA-A*32:01 statistički značajno ($P < 0,05$) češće je bio prisutan kod bolesnika koji su preživljeli duže od pet godina nakon dijagnoze EN (tablica 35).

Tablica 35. Prikaz raspodjele alela[#] lokusa HLA-A, -B i -DRB1 među EN bolesnicima s obzirom na preživljenje <5 godina (N=32) i ≥ 5 godina (N=79)

HLA-A*	EN BOLESNICI <5 g. (N=32)		EN BOLESNICI ≥ 5 g. (N=79)		P
	n	AF	n	AF	
02:01	26	0,4063	40	0,2532	0,0344
03:01	6	0,0938	19	0,1203	0,6466
25:01	1	0,0156	6	0,0380	0,6762
31:01	-	-	7	0,0443	0,1968
31:02	2	0,0313	-	-	0,0822
32:01	-	-	11	0,0696	0,0363
HLA-B*					
13:02	1	0,0156	6	0,0380	0,6762
18:01	4	0,0625	17	0,1076	0,4477

27:02	3	0,0469	4	0,0253	0,4141
35:01	3	0,0469	16	0,1013	0,2890
38:01	6	0,0938	10	0,0633	0,4058
40:02	3	0,0469	4	0,0253	0,4141
50:01	2	0,0313	-	-	0,0822
51:01	7	0,1094	11	0,0696	0,4149
HLA-DRB1*					
01:01	3	0,0469	17	0,1076	0,1922
03:01	5	0,0781	19	0,1203	0,4764
04:02	8	0,1250	6	0,0380	0,0264
11:01	7	0,1094	14	0,0886	0,1696
13:02	3	0,0469	2	0,0127	0,1455
13:03	2	0,0313	1	0,0063	0,2002

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n-broj uočenih alela; AF - učestalost alela HLA; # - u tablici su prikazani samo geni HLA za koje je uočena razlika $\geq 2\%$ između dvije podskupine bolesnika

Na lokusu HLA-B niti jedan alel nije pokazao statistički značajne razlike između podskupina. Učestalosti dva alela (HLA-DRB1*03:01 i HLA-DRB1*04:02) bile su statistički značajno različite između EN bolesnika kada smo ih podijelili s obzirom na preživljenje nakon dijagnoze bolesti.

5.4.3. Raspodjela haplotipova HLA

5.4.3.1. Raspodjela haplotipova HLA-B~DRB1 (niska rezolucija)

U tablici 36. prikazana je raspodjela haplotipova lokusa HLA-B~DRB1 između podskupine bolesnika kod kojih je preživljenje od postavljanja dijagnoze bilo manje ili više od pet godina. Niti jedan haplotip HLA-B~DRB1 nije pokazao razliku u zastupljenosti između podskupina.

Tablica 36. Prikaz raspodjele haplotipova[#] lokusa HLA-B~DRB1 (niska rezolucija) među EN bolesnicima s obzirom na preživljenje <5 godina (N=32) i ≥5 godina (N=79)

HLA-B*~DRB1*	EN BOLESNICI <5 g. (N=32)		EN BOLESNICI ≥5 g. (N=79)		P
	n	HF	n	HF	
07~07	-	-	3,4	0,0216	0,3270
07~15	3,0	0,0469	4,6	0,0291	0,6928
08~03	4,0	0,0625	11,0	0,0696	1,0000
13~07	-	-	3,0	0,0193	0,5587
18~11	3,0	0,0469	9,7	0,0614	0,7614
18~16	-	-	3,0	0,0193	0,5587
27~16	3,0	0,0469	3,4	0,0218	0,3584
35~01	-	-	7,8	0,0491	0,1087
35~03	-	-	3,0	0,0193	0,5587
35~04	-	-	4,0	0,0253	0,3270
35~07	-	-	2,6	0,0164	0,5587
35~11	3,0	0,0460	4,8	0,0301	0,6928
35~16	2,0	0,0313	3,5	0,0221	1,0000
38~04	4,0	0,0625	6,0	0,0380	0,4791
39~16	-	-	4,0	0,0253	0,3270
40(B61)~11	3,0	0,0469	3,0	0,0190	0,3584
44~11	-	-	6,5	0,0414	0,1968
44~16	4,0	0,0625	4,0	0,0254	0,2320
51~04	3,0	0,0469	1,0	0,0063	0,0733
51~11	3,0	0,0469	2,0	0,0127	0,1455

51~13	-	-	3,0	0,0193	0,5587
51~15	-	-	3,0	0,0193	0,5587

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih haplotipova HLA-B~DRB1; HF - učestalost haplotipa HLA-B~DRB1; # - u tablici su prikazani samo haplotipovi HLA - B~DRB1 uočeni $\geq 3x$ unutar pojedine podskupine bolesnika

5.4.3.2. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija)

U prikazu raspodjele haplotipova HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija), uočenih tri ili više puta (tablica 37) samo je razlika u frekvencijama haplotipa HLA-A*02~B*40(B61)~DRB1*11 bila na granici statističke značajnosti ($P=0,0544$).

Tablica 37. Prikaz raspodjele haplotipova[#] lokusa HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija) među EN bolesnicima s obzirom na preživljenje <5 godina ($N=32$) i ≥ 5 godina ($N=79$)

HLA-A*~B*~DRB1*	EN BOLESNICI <5 g. (N=32)		EN BOLESNICI ≥ 5 g. (N=79)		P
	n	HF	n	HF	
01~08~03	2,0	0,0313	7,0	0,0443	1,0000
02~07~15	2,0	0,0313	-	-	0,0803
02~08~03	-	-	3,0	0,0190	0,5587
02~08~16	2,0	0,0313	-	-	0,0803
02~18~11	2,0	0,0313	6,0	0,0380	1,000
02~35~16	3,0	0,0469	2,0	0,0127	0,1455
02~39~16	-	-	4,0	0,0253	0,3270
02~40(B61)~11	3,0	0,0469	-	-	0,0544
02~44~11	-	-	4,0	0,0253	0,3270
02~44~16	3,0	0,0469	2,0	0,0127	0,1455
02~51~11	2,0	0,0313	-	-	0,0803

03~07~07	-	-	3,0	0,0190	0,5587
03~38~13	2,0	0,0313	-	-	0,0803
11~35~01	-	-	4,0	0,0253	0,3270
24~07~15	-	-	3,0	0,0190	0,5587
24~18~16	-	-	3,0	0,0190	0,5587
24~35~11	2,0	0,0313	4,0	0,0253	1,000
26~38~04	4,0	0,0625	4,0	0,0253	0,2320

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n - broj uočenih haplotipova HLA-A~B~DRB1; HF - učestalost haplotipa HLA-A~B~DRB1; () - serološki ekvivalent; # - u tablici su prikazani samo haplotipovi uočeni $\geq 3x$ unutar pojedine podskupine bolesnika

5.4.3.3. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija)

U tablici 38. prikazani su haplotipovi HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija) između podskupina EN bolesnika kod kojih je preživljenje od postavljanja dijagnoze bilo manje ili više od pet godina.

Tablica 38. Prikaz raspodjele haplotipova[#] lokusa HLA-A~B~DRB1 (visoka rezolucija) među EN bolesnicima s obzirom na preživljenje <5 godina (N=32) i ≥ 5 godina (N=79)

HLA-A*~B*~DRB1*	EN BOLESNICI < 5 g (N=32)		EN BOLESNICI ≥ 5 g (N=79)		P
	n	HF	n	HF	
01:01~08:01~03:01	1,0	0,0156	7,0	0,0443	0,4437
02:01~08:01~03:01	3,0	0,0469	3,0	0,0190	0,3584
02:01~18:01~11:01	-	-	4,0	0,0253	0,3270
02:01~35:03~16:01	-	-	4,0	0,0253	0,3270
02:01~39:01~16:01	-	-	3,0	0,0190	0,5587
02:01~44:02:01g~16:01	3,0	0,0469	2,0	0,0127	0,1455

03:01~07:02~07:01	-	-	3,0	0,0190	0,5587
11:01~35:01~01:01	-	-	3,0	0,0190	0,5587
24:02~07:02~15:01	-	-	3,0	0,0190	0,5587
24:03~18:01~16:01	-	-	3,0	0,0190	0,5587
26:01~38:01~04:02	4,0	0,0625	1,0	0,0063	0,0252

Kazalo: EN - endemska nefropatija; n – broj uočenih haplotipova HLA-A~B~DRB1; HF - učestalost haplotipa HLA-A~B~DRB1; B*44:02:01g (B*44:02 ili B*44:27); # - u tablici su prikazani samo haplotipovi uočeni $\geq 3x$ unutar pojedine podskupine bolesnika

Od 11 haplotipova HLA-A~B~DRB1 uočenih $\geq 3x$ u jednoj od podskupina, haplotip HLA-26:01~B*38:01~DRB1*04:02 pokazao je statistički značajnu razliku ($P=0,0252$) u zastupljenosti između dvije analizirane podskupine bolesnika.

Iz rezultata iznesenih u tablici 39 vidljivo je da je ponovno alel HLA-DRB1*04:02 pokazao najvišu statističku značajnost između podskupine bolesnika i kontrole (12,50% naspram 2,37%; $P=0,0004$; $OD=6,70$; 95% $CL=2,36-19,03$).

Niti jedan alel ili haplotip HLA nije pokazao statistički značajno sniženu učestalost u skupini EN bolesnika s UUC-om i preživljenjem kraćim od 5 godina od postavljanja dijagnoze u usporedbi s kontrolom. Ni više od 4x niža učestalost alela HLA-B*57:01 (1,56%) spram kontrole (6,84%) nije dosegla statističku značajnost ($P>0,05$).

Tablica 39. Zbirni prikaz alela i haplotipova HLA koji su statistički značajno POVIŠENI u skupini bolesnika s EN s obzirom na preživljenje (<5 godina) od postavljanja dijagnoze (N=32) u usporedbi s kontrolnom skupinom (N=190)

HLA-			EN	KONTROLA	P	OD (95% CI)
A*	B*	DRB1*	BOLESNICI <5 g (N=32) %	(N=190) %		
		04:02	12,50	2,37	0,0004	6,70 (2,36-19,03)
	44	16	6,25	1,30	0,0035	13,43 (2,35-76,75)
02	40(B61)	11	4,69	-	0,0124	45,20 (2,28-897,56)
02	44	16	4,69	0,71	0,0266	6,45 (1,24-33,49)
26	38	04	6,25	1,58	0,0290	4,38 (1,16-16,50)
02:01	08:01	03:01	4,69	-	0,0124	45,20 (2,28-897,56)
26:01	38:01	04:02	6,25	0,53	0,0035	13,43 (2,34-76,75)

Kazalo: EN - endemska nefropatija; % - učestalost alela/haplotipa HLA; OD - omjer izgleda; CI - interval pouzdanosti

Zbirni prikaz alela i haplotipova HLA koji su bili statistički značajno povišeni u podskupini EN bolesnika s preživljenjem dužim od 5 godina pokazan je u tablici 40. Najveća P vrijednost ($P < 0,01$) utvrđena je za razliku u zastupljenosti haplotipa HLA-B*18~DRB1*11 (6,14%) među EN bolesnicima koji su živjeli duže od 5 godina nakon postavljanja dijagnoze bolesti u odnosu na kontrolu (1,35%).

Niti jedan gen/alel/haplotip HLA nije pokazao statistički značajno sniženu učestalost u skupini bolesnika s EN s obzirom na preživljenje duže od 5 godina od postavljanja dijagnoze u usporedbi s kontrolom. Dvostruko niža učestalost gena/alela HLA-B*57-B*57:01 (3,17%) spram kontrole (6,84%) nije dosegla statističku značajnost ($P < 0,01$).

Tablica 40. Zbirni prikaz gena/alela/haplotipova HLA koji su statistički značajno POVIŠENI u skupini bolesnika s EN s obzirom na preživljenje ≥ 5 godina od postavljanja dijagnoze (N=79) u usporedbi s zdravom kontrolnom skupinom (N=190)

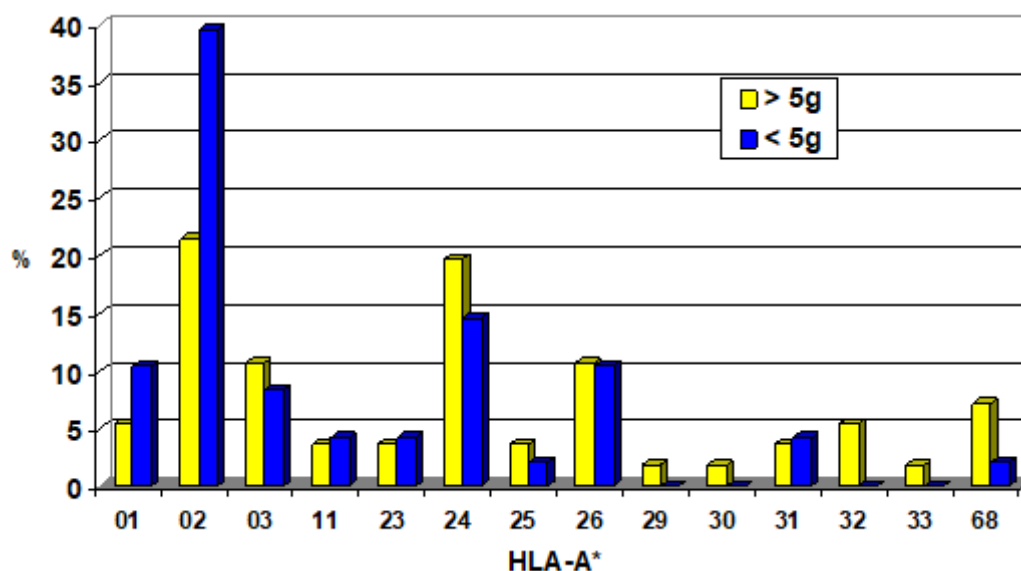
HLA-			EN	KONTROLA	P	OD (95% CI)
A*	B*	DRB1*	BOLESNICI >5 g (N=79) %	(N=190) %		
	18	11	6,14	1,35	0,0030	5,36 (1,77- 16,25)
02	18	11	3,80	0,79	0,0233	5,12 (1,24-21,02)
02:01	35:03	16:01	2,53	0,26	0,0402	10,08 (1,11-61,67)

Kazalo: EN - endemska nefropatija; % - učestalost gena/alela/haplotipa HLA; OD - omjer izgleda; CI - interval pouzdanosti

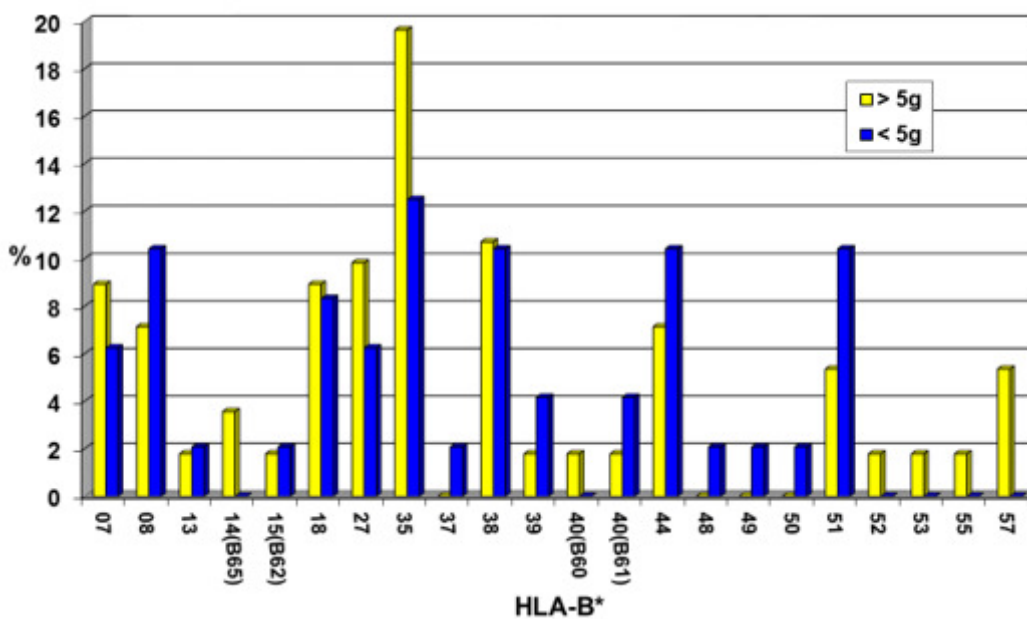
5.5. RASPODJELA GENA, ALELA I HAPLOTIPOVA LOKUSA HLA-A, -B I -DRB1 UNUTAR SKUPINE BOLESNIKA S ENDEMSKOM NEFROPATIJOM I KARCINOMOM UROTELA GORNJEGA UROTRAKTA S OBZIROM NA PREŽIVLJENJE

5.5.1. Raspodjela gena lokusa HLA-A, -B i -DRB1

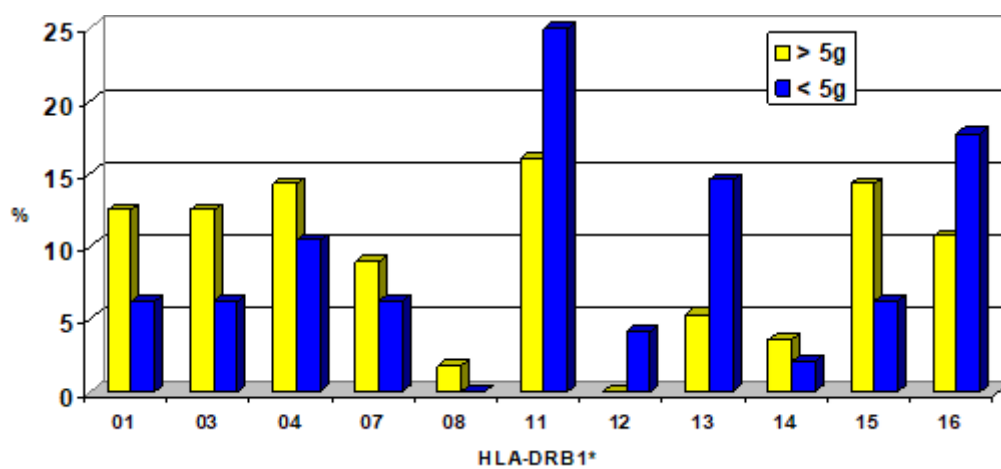
Uspoređujući raspodjelu gena lokusa HLA-A, -B i -DRB1 među EN bolesnicima s UUC obzirom na petogodišnje preživljenje nakon postavljanja dijagnoze (slike 8-10) otkriveno je da je povišena učestalost gena HLA-A*02 među EN bolesnicima s UUC-om i preživljenjem kraćim od 5 godina bila na granici statističke značajnosti ($P=0,0542$).



Slika 8. Usporedba raspodjele gena lokusa HLA-A među EN bolesnicima s UUC obzirom na preživljenje <5 g (N=24) i >5 g (N=28) nakon dijagnoze



Slika 9. Usporedba raspodjele gena lokusa HLA-B među EN bolesnicima s UUC obzirom na preživljenje <5 g (N=24) i >5 g (N=28) nakon dijagnoze



Slika 10. Usporedba raspodjele gena lokusa HLA-DRB1 među EN bolesnicima s UUC s obzirom na preživljenje <5g (N=24) i >5g (N=28) nakon dijagnoze

5.5.2. Raspodjela haplotipova HLA

5.5.2.1. Raspodjela haplotipova HLA-B~DRB1 (niska rezolucija)

Učestalosti haplotipova HLA-B~DRB1 (niska rezolucija) među EN bolesnicima s UUC obzirom na preživljenje (<5 g ili ≥5 g) prikazane su u tablici 41. Među 12 prikazanih haplotipova uočena je statistički značajna razlika (P=0,0423) za haplotip HLA-B*44~DRB1*16 koji je u podskupini bolesnika s preživljenjem <5 g. pokazao učestalost od 8,3%, a dok u drugoj podskupini nije otkriven.

Tablica 41. Prikaz raspodjele haplotipova[#] lokusa HLA-B~DRB1 (niska rezolucija) među EN bolesnicima s UUC obzirom na preživljenje (<5 godina, N=24 i ≥5 godina, N=28) nakon dijagnoze

HLA-B*~DRB1*	EN BOLESNICI S UUC <5 g (N=24)		EN BOLESNIC S UUC ≥5 g (N=28)		P
	n	HF	n	HF	
07~15	2,0	0,0417	3,0	0,0536	1,0000
08~03	3,0	0,0625	4,0	0,07143	1,0000
18~11	3,0	0,0625	3,0	0,0536	1,0000
27~16	3,0	0,0625	-	-	0,0950
35~04	-	-	4,0	0,0714	0,1222
35~11	3,0	0,0625	-	-	0,0950
35~15	-	-	3,0	0,0536	0,2472
35~16	-	-	4,0	0,0714	0,1222
38~04	4,0	0,0833	4,0	0,0714	1,0000
44~11	-	-	3,0	0,0536	0,2472
44~16	4,0	0,0833	-	-	0,0423
51~11	3,0	0,0625	-	-	0,0950

Kazalo: EN - endemska nefropatija; UUC - karcinom urotela gornjega urotrakta; n - broj uočenih haplotipova HLA-B~DRB1; HF - učestalost haplotipa HLA-B~DRB1; # - u tablici su prikazani samo haplotipovi uočeni ≥3x unutar pojedine podskupine bolesnika

5.5.2.2. Raspodjela haplotipova HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija)

U podskupinama EN bolesnika s UUC-om i preživljenjem duže ili kraće od 5 godina niti jedan haplotip HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija) nije bio statistički značajno češće prisutan (tablica 42).

Tablica 42. Prikaz raspodjele haplotipova[#] lokusa HLA-A~B~DRB1 (niska rezolucija) među EN bolesnicima s UUC obzirom na preživljenje <5 godina (N=24) i ≥5 godina (N=28) nakon dijagnoze

HLA-A*~B*~DRB1*	EN BOLESNICI S UUC <5 g (N=24)		EN BOLESNIC S UUC ≥5 g (N=28)		P
	n	HF	n	HF	
02~35~16	2,0	0,0417	3,0	0,0536	1,0000
02~44~16	3,0	0,0625	-	-	0,0950
24~08~03	-	-	3,0	0,0536	0,2472
24~35~04	-	-	3,0	0,0536	0,2499
26~38~04	3,0	0,0625	3,0	0,0536	1,0000

Kazalo: EN - endemska nefropatija; UUC - karcinom urotela gornjega urotrakta; n - broj uočenih haplotipova HLA-A~B~DRB1; HF - učestalost haplotipa HLA-A~B~DRB1; # - u tablici su prikazani samo haplotipovi uočeni ≥3x unutar pojedine podskupine bolesnika

5.6. ANALIZA GENA/ALELA/HAPLOTIPOVA LOKUSA HLA-A, -B i -DRB1 MEĐU ZDRAVIM SRODNICIMA BOLESNIKA S ENDEMSKOM NEFROPATIJOM

Osim skupine EN bolesnika u radu je testirana i skupina zdravih srodnika (braća, sestre, djeca, unučad) koji žive na endemskom području duže od 14 godina i nemaju nikakve simptome bolesti. Istraživanjem su obuhvaćena 52 srodnika od ukupno 20 bolesnika. Životna dob srodnika iznosila je od 14-76 g., Srednja vrijednost godina iznosila je 45 g. U medicinskoj dokumentaciji zdravih srodnika u ambulancama liječnika obiteljske medicine nisu nađeni podaci koji bi govorili u prilog bolesti od EN.

Svim srodnicima također su određeni geni/aleli/haplotipovi lokusa HLA-A, -B i -DRB1. Među srodnicima nije analizirana učestalosti gena/alela/haplotipova HLA, nego je analizirano imaju li podložni, odnosno zaštitnih alel/haplotip HLA koji su među EN bolesnicima pokazali statistički značajnu razliku u usporedbi s kontrolom. U tablici 43 prikazani su rezultati takve analize.

Tablica 43. Zbirni prikaz srodnika (braća/sestre/djeca) bolesnika s endemskom nefropatijom koji su nositelji podložnih/zaštitnih alela i haplotipova HLA

HLA	RIZIK	SRODNICI (BRAĆA/SESTRE/DJECA)		
		Σ	poz	neg
A*01:01	↓	13	9	4
B*27:05	↓	3	2	1
B*57:01	↓	2	1	1
HLA				
DRB1*04:02	↑	0	0	0
B*18~DRB1*11	↑	6	5	1
B*38~DRB1*04	↑	0	0	0
B*44~DRB1*16	↑	11	5	6
A*02~B*18~DRB1*11	↑	2	1	1
A*26:01~B*38:01~DRB1*04:02	↑	0	0	0

Kazalo: EN – endemska nefropatija; ↑ - statistički značajno povišen među EN bolesnicima; ↓ - statistički značajno snižen među EN bolesnicima

6. RASPRAVA

Istraživanja povezanosti sustava HLA i bolesti koja se provode dugi niz godina pomogla su razumijevanju imunološkog odgovora organizma, etiologiji brojnih bolesti (uključujući i karcinome), osjetljivosti na neke lijekove ali i objašnjenju zaštitnih mehanizama u obrani od pojedinih zaraznih bolesti. (137, 138) Istovremeno je razvoj molekularnih metoda omogućio istraživanja na razini gena što je dovelo do preciznijeg otkrivanja uloge gena/alela HLA u spomnutim područjima biologije, odnosno medicine. Ovakva saznanja mogu ne samo pomoći u otkrivanju genetskih faktora koji dovode do nastanka bolesti već i pomoći u razvoju i primjeni potencijalno bolje, odnosno specifičnije terapije u bolestima povezanim sa sustavom HLA. (139)

U dosadašnjim istraživanjima geni HLA pojavili su se kao rizični čimbenici u većini imunološki posredovanih bubrežnih bolesti što zajedno s ostalim genetičkim čimbenicima dovodi do imunološkog odgovora. (127) Za razliku od imunološki posredovanih bubrežnih bolesti koje su bile predmet brojnih istraživanja, radovi o povezanosti gena HLA i endemske nefropatije su malobrojni. Još su sredinom prošlog stoljeća započeta istraživanja endemske nefropatije u endemskim područjima Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Srbije, Rumunjske i Bugarske, a 1976. g. objavljeni su rezultati studije o raspodjeli antigena HLA među EN bolesnicima iz Bugarske. (140) Dobiveni rezultati su ukazali na potrebu proširivanja istraživanja na veću skupinu bolesnika, ali i uključivanje i drugih zemalja u kojima je prisutna EN. Međutim, osim rada s preliminarnim rezultatima prikazanim tijekom radnog sastanka "HLA Workshop - Sofia 1976" takva istraživanja nisu nastavljena. Stoga je cilj ove doktorske disertacije bio analizirati gene, alele i haplotipove lokusa HLA-A, -B i -DRB1 u skupini nesrodnih EN bolesnika (N=111), dobivene rezultate usporediti s zdravom kontrolom te tako po prvi puta dobiti uvid o polimorfizmu HLA, na molekularnoj razini, među EN bolesnicima iz Republike Hrvatske.

Raspodjela gena na lokusima HLA-A, -B i -DRB1 među EN bolesnicima pokazala je statistički značajnu razliku za gene HLA-A*01 i HLA-B*57 (snižene učestalosti među bolesnicima u usporedbi s kontrolom), dok na lokusu HLA-DRB1 niti jedan gen nije pokazao statistički značajnu razliku u zastupljenosti. Dobiveni rezultati nisu potvrdili rezultate istraživanja među EN bolesnicima iz Bugarske, kao ni unutar skupine hrvatskih bolesnika iz 1976. godine. Naime, rad bugarskih

autora ukazao je na povišenu učestalost antigena HLA-B18 među EN bolesnicima što nije slučaj u našem radu. Učestalost gena HLA-B*18 bila je neznatno povišena među EN bolesnicima u usporedbi sa zdravim ispitanicima (9,5% naspram 6,6%; $P > 0,05$). (140) Također, ovim istraživanjem nije potvrđena ni povišena zastupljenost antigena HLA-B35, među bolesnicima iz Hrvatske, o kojoj su izvjestili Kaštelan i suradnici. (141) S druge strane, najčešći gen na lokusu HLA-A u našim testiranim skupinama bio je gen HLA-A*02 što je u skladu s prethodnim istraživanjima naše populacije, a to je i najčešći gen u populacijama evropskog porijekla. (142,143) Zanimljivo je spomenuti da je za gen HLA-A*02 uočena pozitivna povezanost s dijabetičkom nefropatijom među bolesnicima porijeklom iz SAD-a i Kanade. (144)

Dosadašnja, pojedinačna istraživanja povezanosti sustava HLA i bubrežnih bolesti koje dovode do kroničnog zatajenja bubrega, kao što je slučaj i kod EN; pokazala su povezanost s različitim genima lokusa HLA-A, -B i -DRB1. (145) Treba istaknuti istraživanje iz 2020. godine koje je uključilo različite populacije i koristeći meta-analizu pokazalo pozitivnu povezanost gena HLA-A*11, -DRB1*04 i -DRB1*11 s kroničnim zatajenjem bubrega koje je bilo uglavnom autoimune prirode ali različite etiopatogeneze (hipertenzivna nefropatija, policistična bolest bubrega, fokalni segmentalni glomerulonefritis, membranозна nefropatija, mezangioproliferativni glomerulonefritis, Churg Strauss syndrome, post streptokokni glomerulonefritis, Sjögren syndrome, Lupus erithematosus, dilatativna kardiomiopatija. (146) U ovom radu nismo otkrili povećanu učestalost niti jednog od navedenih gena HLA koje spominju autori meta-analize. Naši rezultati na visokoj razini, tj. na razini alela HLA pokazali su da su osim alela već prije spomentih gena (HLA-A*01:01 i -B*57:01) još dva alela statistički značajno različito zastupljena u skupini EN bolesnika (HLA-B*27:05 i alel HLA-DRB1*04:02). Rezultati govore u prilog zaštitnoj ulozi alela HLA-B*27:05 za razvoj EN. Ovakav rezultat je iznenađujući s obzirom da je riječ o alelu koji je pozitivno povezan s čitavim nizom reumatskih bolesti, naročito ankilozantnim spondilitisom. (147) Nalaz je ne samo nužno potvrditi na većem broju ispitanika, već bi bilo zanimljivo vidjeti i njegovu učestalost među EN bolesnicima iz drugih zemalja u kojima se bolest javlja. Jedini alel HLA koji se pokazao kao podložan za nastanak EN bio je alel HLA-DRB1*04:02 (6,3% naspram 2,4%; $P < 0,05$). To je možda na tragu rezultata već prije navedene meta-analize iz 2020. godine, no u toj analizi

nisu obrađeni podaci na razini alela HLA, već samo na razini gena HLA. Iako je EN bolest koja nema istu etiopatogenezu kao bolesti navedene u radu, zajedničko im je da sve dovode do kroničnog zatajenja bubrega pa se može pretpostaviti da su geni HLA jedan od genetskih čimbenika kako u nastanku tih bolesti, tako i u EN-u zbog svoje uloge odnosno prezentacije stranih peptida vlastitim limfocitima T. U ovom trenutku ne možemo objasniti mehanizam te povezanosti što je vrlo slično kao i kod pozitivne povezanosti alela HLA-DRB1*04:02 s razvojem pemfigus vulgarisa (PV), poligenske bolesti uzrokovane genetskim i hormonalnim čimbenicima, kao i čimbenicima okoliša. (148) Naime, dosadašnje spoznaje o osnovi mehanizma povezanosti alela HLA-DRB1*04:02 i PV su predmet spekulacija. Međutim, sve hipoteze povezanosti alela HLA s bolestima u osnovi imaju određene alele HLA koji imaju veći/manji afinitet za prezentaciju peptida, a u slučaju EN to bi bili neki od peptida iz biljke *Aristolochia clematitis*. Interesantno je dodatno spomenuti i da je alel HLA-DRB1*04:02 istovremeno zaštićen za razvoj reumatoidnog artritisa pa će rasvjetljavanje njegove oprečne povezanosti s navedenim bolestima vjerojatno razotkriti mehanizme nastanka poligenskih bolesti povezanih sa sustavoma HLA, uključujući i EN te pružiti nove mogućnosti liječenja, kako u bolestima povezanim s genima HLA tako možda i kod EN. (149) Međutim, bez dodatnih istraživanja povezanosti EN i HLA neće biti moguće doći do takvih saznanja jer je ta povezanost možda samo rezultat rasprostranjenosti tog alela u našim krajevima. Naime, ako pogledamo porijeklo alela HLA-DRB1*04:02 vidimo da je nastao na Bliskom Istoku od kuda se širio dalje po Evropi i svijetu. (150,151) U skladu s tim mu je i učestalost tj. pada od juga prema sjeveru Evrope. Iz dostupnih populacijskih podataka zastupljenost alela HLA-DRB1*04:02 u zemljama gdje se javlja EN varira od 2,2% u Rumunjsko, 2,7% u Srbiji do 3,6% u Bugarskoj (Hrvatska - 2,4%).

Osim analize zastupljenosti alela HLA u rad je bila uključena i analiza haplotipova HLA (HLA-B~DRB1 i HLA-A~B~DRB1) s ciljem da se utvrdi postoji li neka kombinacija alela HLA koja je podložna/zaštitna za nastanak EN. Povod za takvu analizu bili su podaci o povezanosti haplotipa HLA s bolestima. (152-154) Na žalost takvih analiza nema, ne samo za EN, već i za brojne druge bolesti bubrega, odnosno za sada je samo jedno istraživanje (po našim saznanjima) u svoje rezultate uključilo ne samo analizu gena HLA na pojedinom lokusu HLA već i kombinaciju gena na istom lokusu HLA kao i kombinaciju gena na različitim

lokusima HLA među bolesnicima s kroničnim zatajenjem bubrega. (155,156) Autori su otkrili pozitivnu povezanost s određenim kombinacijama gena na lokusu HLA-A (pozitivna povezanost s kombinacijom HLA-A*03/HLA-A*26) ali ne s kombinacijama gena na različitim lokusima HLA tj. haplotipom HLA. (157) Iz tih naloga nismo bili u mogućnosti usporediti naše podatke s rezultatima drugih studija. Ono što možemo naglasiti da je među bolesnicima s EN uočena povećana učestalost tri haplotipa HLA-B~DRB1 (HLA-B*18~DRB1*11, HLA-B*38~DRB1*04 i HLA-B*44~DRB1*16), te haplotipa HLA-A*02~B*18~DRB1*11, koji su se u ovom radu pokazali kao podložni za razvoj EN. Istovremeno niti jedna kombinacija alela HLA nije se pokazala kao zaštitna za nastanak bolesti. Dobivene rezultate je nužno potvrditi na većem uzorku EN bolesnika kako iz Hrvatske, ali isto tako i potaknuti istraživače iz drugih zemalja gdje je prisutna EN da provedu ovu vrstu analize.

Bez obzira što je incidencija EN u endemskim selima u padu i u istraživanju iz 2005. godine (2) iznosila je 2,3% za područje od približno 10,500 stanovnika, to je i dalje više u usporedbi s drugim endemskim područjima kao što je na primjer u području rijeke Kolubare u Srbiji gdje iznosi približno 1,7%. (158,159) Postoji nekoliko objašnjenja za smanjenje incidencije u Hrvatskoj, a jedno je duži životni vijek kroničnih bolesnika, zatim smanjenjena količina ili potpuni izostanak štetnog agensa u endemskom području, zatim usaglašavanje dijagnostičkih kriterija koji su se mijenjali tijekom godina. Taj podatak je u skladu s istraživanjem provedenim u Srbiji koje govori da je broj oboljeli od EN ali i karcinoma urotela gornjega urotakta u južnoj Srbiji u padu. (160)

U ovom radu omjer spolova među EN bolesnicima bio je podjednak, dok je analiza životne dobi kad se EN manifestirala (prije ili nakon 65. godine života) pokazala tendenciju oboljevanja osoba starijih od 65. godine (58,6%). Također je ovim istraživanjem potvrđeno da muškarci statistički značajno češće ($P=0,0341$) oboljevaju prije 65. godine života nego žene.

Pojava UUC-a u bolesnika s EN-om je jedna od karakteristika ove bolesti. U istraživanjima se navodi da je UUC dominantan među ženama što je u suprotnosti s podacima o populaciji oboljelih od UUC-a izvan endemskog područja. (5) Pojedini autori pak navode da je omjer bolesnika oboljelih od UUC-a podjednak u oba spola. (11) Istraživanja za period od 1965.-1994. godine govore da je incidencija UUC-a na endemskom području Brodsko-posavske županije bila

20-26 puta veća nego na području cijele županije, dok su podaci o oboljelima od UUC-a pokazali da je u endemskom području zabilježeno više bolesnica. (161) S druge strane stopa incidencije UUC-a u Hrvatskoj za 2018. godinu iznosila je za oba spola za karcinom bubrežne čašice i nakapnice (C65) zbirno 1,2 na 100,000 stanovnika. Od toga za muškarce iznosila je 1,6 na 100,000, a za žene 0,9. Podaci za incidenciju karcinoma mokraćovoda (C66) govore o 0,8 slučajeva na 100,000 stanovnika. I ovdje je veća stopa za muškarce (1,0 na 100,000), dok je za žene nešto manja i iznosi 0,6 na 100,000 stanovnika. (162)

Usporedba rezultata za Hrvatsku s podacima za zemlje zapadne Evrope i SAD-a pokazuje da je stopa incidencije za UUC podjednaka.(163) Naime, prema međunarodnoj bazi podataka SEER (engl. The Surveillance, Epidemiology, and End Results) objavljenoj u članku iz 2010. godine incidencija UUC-a za određeno razdoblje iznosila je između 1,5-2,6 slučajeva na 100,000 stanovnika SAD-a i Kanade. (58) U zemljama zapadne Evrope incidencija UUC-a iznosi između 2 slučaja na 100,000 pri tome je omjer spolova 2:1 u korist muškaraca. (164,165) Zanimljivo je spomenuti istraživanje provedeno među bolesnicima s Tajvana gdje je povećana učestalost kroničnog bubrežnog zatajenja i UUC-a u endemskim područjima s povećanom koncentracijom arsena u pitkoj vodi što dovodi do nastanka tzv. "bolesti crnog stopala" (gangrena stopala zbog oštećenja na krvožilnom sustavu). (166) U radu autori iznose podatke da češće od UUC-a oboljevaju žene nego muškarci i to ne samo u endemskom području već i u drugim područjima Tajvana. Autori iz Japana iznose podatke o učestalost UUC-a 2:1 u korist muškaraca, te o porastu smrtnosti od UUC-a. (167,168) Srednja stopa morbiditeta UUC na 100,000 stanovnika RH je iznosila 0,96; za Brodsko-posavsku županiju 3,63, a za endemsko područje 13,40. Specifični morbiditet UUC-a u endemskom području iznosio je 13,90 odnosno za Brodsko-posavsku županiju 3,9 puta više nego za RH.(16) Opći mortalitet endemskog područja za period 1991.-2002.g. nije se značajnije razlikovao od općeg mortaliteta Brodsko-posavske županije i RH.(6) Međutim, specifični mortalitet od EN u istom razdoblju bio je 0,65. U periodu između 1995.-2002.g. specifični mortalitet endemskog područja u odnosu na područje RH za žene je bio znatno veći nego za muškarce i iznosio je 9,02 naspram 4,70. Specifični mortalitet od UUC-a za populaciju endemskog područja je bio 14 puta veći u odnosu na Brodsko-posavsku županiju i čak 55 puta veći u odnosu na RH. (6)

Najnovija studija objavljena 2019.godine na skupini od 608 bolesnika iz Registra za rak Republike Hrvatske potvrdila je da je Brodsko-posavska županija tijekom 2001.-2011. godine imala najveći rizik za UUC, u usporedbi s hrvatskom populacijom u cjelini. (169) Pri tome su u Brodsko-posavskoj županiji žene bile u većem riziku za nastanka UUC-a od muškaraca u usporedbi s ostatkom Hrvatske. Rezultati našeg istraživanja govore u prilog gore navedenim rezultatima spram autora koji navode da nema razlike u spolu u EN populaciji s obzirom na oboljevanje od UUC-a.(11) Nije nađena statistički značajna razlika u histološkom tipu i veličini tumora, stadiju tumora i trajanju preživljenja.(166) Uspoređujući istraživanja provedena u hrvatskom endemskom području s onima iz Tajvana nađeno je su na oba područja prisutni adukti aristolohične kiseline u uzorcima tkiva bubrega i tkiva tumora.(170) Objašnjenje za povećanu učestalost UUC-a na Tajvanu je tradicionalna kineska medicina i ingestije biljnih pripravaka koji u većoj ili manjoj mjeri sadržavaju aristolohičnu kiselinu. Navedeno istraživanje dokazalo je povezanosti aduktata aristolohične kiseline i mutaciju onkogena p53. Slično istraživanje provedeno je u našem endemskom području gdje su također u tkivu bubrega i UUC-u nađeni adukti aristolohične kiseline i transferzija A:T onkogena p53 koja se danas smatra specifičnom mutacijom vezanom uz aristolohičnu kiselinu i etiologiju EN. (146,23,24)

Među našim EN bolesnicima s UUC-om (46,8%) omjer spolova bio je nešto veći u korist žena (žena-55,8% i muškaraca-44,2%; odnosno 1,3:1) što ukazuje na blagu prevagu u korist žena, što je u suprotnosti s učestalošću UUC-a u općoj populaciji. Međutim treba skrenuti pažnju na neujednačenost do sada objavljenih podataka o incidenciji i stopi incidencije UUC-a u Hrvatskoj što možemo vidjeti iz podataka prikupljenih u Registru za rak Republike Hrvatske za vremenski interval od tri godine (2016.-2018.) gdje se incidencija UUC-a (C65 i C66) mijenjala prema spolu. (162) Naši rezultati pokazuju da je približno podjednak broj EN bolesnika s UUC-om imao C65 (44,2%), odnosno C66 (55,8%) pri tome je 38,5% bolesnika imalo samo C65, 48,1% bolesnika C66 dok je 13,4% bolesnika imalo oba karcinoma. Nismo uočili statistički značajnu razliku u sijelu karcinoma i spolu bolesnika iako je među bolesnicima s obje vrste karcinoma bilo više žena (72,4% spram 28,6%) ali s obzirom na mali broj takvih ispitanika (N=7) razlika nije dosegla statističku značajnost. Provedena usporedba spola, dobi pojave bolesti te prisustva UUC-a pokazala je da prije 65. godine života češće oboljevaju

muškarci ali uočena razlika nije dosegla statističku značajnost (muškarci-64,3 % spram žena-35,7%).

Usporedba raspodjele gena i alela HLA između dvije podskupine EN bolesnika (s i bez UUC-a) pokazala je razliku samo za gen HLA-B*27 koji je bio statistički značajno češće prisutan među EN bolesnicima s UUC-om. I haplotip HLA-A*26:01~B*38:01~DRB1*04:02 pokazao je statistički značajnu razliku između dvije podskupne EN bolesnika što govori u prilog da će bolesnici s ovim haplotipom češće razviti UUC. Prema našim saznanjima, kao i literaturnim podacima o podložnosti ovog haplotipa HLA za razvoj bilo koje vrste karcinoma nema. Usporedba EN bolesnika s UUC-om s kontrolom govori također u prilog pozitivnoj povezanosti s haplotipom HLA-A*26:01~B*38:01~DRB1*04:02 ($P=0,0195$; OD 7,83; 95% CI 1,39-44,04). Ovdje treba istaknuti i alel DRB1*04:02 koji je također pokazao pozitivnu povezanost s pojavom UUC-a među EN bolesnicima ($P=0,0117$; OD 3,65; 95% CI 1,33-10,02). Niti jedan alel/gen/haplotip HLA nije se pokazao kao potencijalno zaštitni za nastanak UUC-a među EN bolesnicima.

Vodeći se podacima iz literature za razdoblje od 2000. do 2005. godine koje govori da je srednja dob muškaraca pri postavljanju dijagnoze UUC-a iz endemskog područja Brodsko- posavske županije bila 67 godina, a za žene 75 godina i mi smo naše ispitanike podijelili u dvije skupine. (171) Prvu podskupinu sačinjavali su EN bolesnici kod kojih se bolest javila prije 65. godine života i one kod kojih se bolest razvila nakon 65. godine života. Međusobna usporedba dvije podskupine nije dala statistički značajne razlike, dok je usporedba EN bolesnika kod kojih se bolest pojavila prije 65. godine života s kontrolom ukazala na neke rizične faktore. Najveća P vrijednost uočena je za alel HLA-DRB1*04:02 ($P=0,0053$; OD 4,23; 95% CI 1,54-11,68) a slijedio ga je haplotip HLA-B*18~DRB1*11 ($P=0,0065$; OD 5,55; 95% CI 1,61-19,08) koji su se pokazali kao podložni za pojavu bolesti prije 65. godine života. S druge strane učestalost haplotipa HLA-B*44~DRB1*16 je među bolesnicima u kojih se EN javila nakon 65. godine života je pokazala najveću P vrijednost ($P=0,0029$; OD 11,34; 95% CI 2,29-56,13).

Nadalje, u ovoj studiji prikazana je raspodjela gen/alela/haplotipova HLA unutar skupine EN bolesnika s obzirom na preživljenje od postavljanja dijagnoze bolesti (<5 godina ili ≥ 5 godina). U istraživanje su bili uključeni ne samo bolesnici

liječeni od 2005.-2018. godine već i oni EN bolesnici za koje smo mogli doći do potrebnog materijala za testiranje, te je medijan praćenja bio 9 godina. Usporedba podskupina EN bolesnika s obzirom na preživljenje pokazala je razlike za nekoliko alela na lokusu HLA-A i HLA-DRB1 (tablica 35), dok se među haplotipovima HLA opet istaknuo samo haplotip HLA-A*26:01~B*38:01~DRB1*04:02 koji je bio češće uočen među onim EN bolesnicima kod kojih je preživljenje bilo kraće od 5 godina. Usporedba ove dvije podskupine EN bolesnika s obzirom na preživljenje sa zdravom kontrolom utvrdila je postojanje statistički značajnih razlika (tablice 39 i 40). Najveća vrijednost P ($P=0,0004$) uočena je za alel HLA-DRB1*04:02 među bolesnicima s preživljenjem kraćim od 5 godina što ukazuje na ovaj alel kao potencijalni prognostički biljeg za lošiji ishod bolesti.

U ovom istraživanju podskupinu EN bolesnika s UUC-om dodatno smo podijelili s obzirom na petogodišnje preživljenje od postavljanja dijagnoze (<5 godina ($N=24$) i >5 godina ($N=28$)), dobiveni rezultati su prikazani na slikama 8, 9 i 10. Uočenu razliku za povećanu učestalost gena HLA-A*02 ($P=0,0547$) i haplotipa HLA-B*44~B16 ($P=0,0423$) među bolesnicima koji su živjeli manje od 5 godina nakon postavljanja dijagnoze svakako treba potvrditi na većem uzorku. Razlog tome leži u dobro poznatoj činjenici da je polimorfizam HLA izuzetno velik i da bi ispitivane skupine trebale brojiti minimalno sto ispitanika kako bi dali šansu da se pojave svi uobičajeni geni HLA za istraživanu populaciju. To je teško izvedivo kada su u pitanju neke rijetke bolesti ili pojedini oblici bolesti kod kojih se istražuje povezanost sa sustavom HLA. Stoga navedenu podskupinu EN bolesnika s UUC-om, u kojoj smo analizirali i preživljenje, nismo još dodatno dijelili i s obzirom na životnu dob bolesnika i spol. Dodatnu podjelu bi bilo svakako zanimljivo napraviti u budućim, većim istraživanjima u koja bi bilo poželjno uključiti i bolesnike iz endemskih područja izvan Hrvatske. Na takve dodatne podjele navode nas objavljeni podaci o lošijoj prognozi UUC bolesnika starije životne dobi, odnosno da je starija životna dob statistički značajno povezana s lošijim općim preživljenjem, karcinom specifičnim preživljenjem kao i vremenom bez progresije bolesti. (172,173) Navedeni radovi iznose i podatke da nije bilo statistički značajne razlike s obzirom na spol ispitanika. Opsežna multicentrična studija iz 2009. godine analizirala je veliku skupinu UUC bolesnika ($N=1363$) podvrgnutih radikalnoj nefroureterektomiji (RNU) s obzirom na preživljenje specifično za bolest i/ili povratak tumora i spol. (174) Omjer spolova bio je 2,1:1 u korist muškaraca, žene

su bile starije životne dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze, no nije nađena statistički značajna povezanost između spola i povrata bolesti, odnosno preživljenja. (175) Slična retrospektivna studija iz 2011. godine koja je uključila bolesnike s UUC-om iz Azije, Kanade i Evrope kod kojih je učinjena RNU također nije otkrila povezanost s recidivom i /ili preživljenjem specifičnim za bolest prema spolu i histopatološkim nalazom. (176) Nasuprot tome, rad autora iz Tajvana prikazao je rezultate liječenja te postojanje razlike u preživljenju i spolu kao prognostičkim faktorom za UUC. (177) Među našim EN bolesnicima s UUC-om omjer spolova je bio 1,3:1 u korist žena, s obzirom da je riječ o malim skupinama unutar njih nismo pratili raspodjelu gena/alela/haplotipova HLA što bi možda bilo dobro napraviti u slučaju većih skupina. Iako dostupna literatura za neke druge bolesti povezane s genima HLA nije našla razliku u učestalosti gena HLA između muškaraca i žena. (178-180)

Za dio EN bolesnika s UUC-om imali smo patohistološke nalaze o invazivnosti karcinoma, dok nam za manji dio bolesnika takvi podaci nisu bili dostupni. Razloga za to je više, prvo svi EN bolesnici s UUC-om nisu bili operirani u OB "Dr Josip Benčević" te u njihovoj raspoloživoj medicinskoj dokumentaciji nije bilo podataka, drugo zbog toga što dio dostupne medicinske dokumentacije nema prateći patohistološki nalaz, a treće su oni bolesnici kojima je klasifikacija karcinoma napravljena prema danas nevažećoj klasifikaciji, a zbog vremenskog odmaka, materijala za novo klasificiranje više nije bilo. U cijeloj skupini bolesnika s UUC-om, njih 59,5% imalo je invazivni oblik UUC-a (pT2, pT3, pT4) a neinvazivni oblik UUC-a (pTa, pTia, pT1) imalo je 40,5% bolesnika. Razlika u invazivnosti karcinoma između muškaraca i žena nije dostigla statističku značajnost iako je unutar skupine muškaraca 75% njih imalo invazivni oblik, dok je taj postotak kod žena iznosio 52%. U svakom slučaju bilo bi zanimljivo napraviti analizu zastupljenosti gena/alela/haplotipova HLA na većem uzorku koja bi uključila invazivnost karcinoma i životnu dob te otkriti postoje li neki podložni, odnosno zaštitni genetski čimbenici HLA. Povod za takav pristup su rezultati studije koji iznose podatke da stadij i veći stupanj proširenosti bolesti su češći u skupini UUC bolesnika starije životne dobi te predstavljaju značajne prognostičke faktore u petogodišnjem preživljenju nakon RNU ili segmentalne ureterektomije. (181)

U rad smo uključili i skupinu od 52 zdrava srodnika od 20 EN bolesnika te smo analizirali moguće prisustvo zaštitnih, odnosno podložnih

gena/alela/haplotipova HLA. Podložni haplotipovi HLA koji bi mogli nositi rizik za kasniji nastanak EN nađeni su kod pet zdravih srodnika mlađih od prosječne životne dobi kada se EN javlja, dok je šest srodnika u dobi kad se bolest mogla javiti ali su zdravi. Stoga će u budućnosti biti zanimljivo pratiti i vidjeti korelaciju između naših rezultata i zdravstvenog stanja svakog od njih, odnosno hoće li kod mlađih srodnika koji su pozitivni za biljege HLA koji su se pokazali kao podložni za razvoj endemske nefropatije doći do razvoja bolesti.

Na kraju možemo reći da rezultati ovog istraživanja ukazuju na postojanje povezanosti polimorfizama HLA i EN. Jedna druga studija je također pokazala da je regija kraćeg kraka kromosoma 6 povezana s molekularnom patogenezom EN. (33) U spomenutoj studiji sekvenciranjem 22000 gena unutar skupine EN bolesnika došlo se do 3 moguća gena CELA1, HSPGN2 i KCNK5 povezana s EN, pri čemu je potrebno naglasiti da je gen KCNK5 smješten na kromosomu 6p21.2 vrlo blizu regije HLA. Iz svega navedenog možemo zaključiti da je istraživanje povezanosti gena HLA i EN ne samo opravdano već bi ga bilo uputno i proširiti i na druge lokuse HLA (npr. HLA-C) što bi moglo pomoći u rasvijetljavanju povezanosti sustava HLA i endemske nefropatije.

7. ZAKLJUČCI

1. Alel HLA-DRB1*04:02, tri haplotipa HLA-B~DRB1 (HLA-B*18~DRB1*11, HLA-B*38~DRB1*04 i HLA-B*44~DRB1*16) kao i produženi haplotip HLA-A*02~B*18~DRB1*11 bili su statistički značajno češće uočeni u skupini EN bolesnika što upućuje da su podložni za nastanak bolesti.
2. Aleli HLA-A*01:01, HLA-B*27:05 i HLA-B*57:01 bili su statistički značajno manje zastupljeni u skupini EN bolesnika, što govori u prilog njihovoj zaštitnoj ulozi u razvoju bolesti.
3. Međusobna usporedba podskupina EN bolesnika s obzirom na prisustvo UUC pokazala je razliku za haplotip HLA-A*26:01~B*38:01~DRB1*04:02 koji je bio statistički značajno češće prisutan među EN bolesnicima s UUC-om u odnosu na bolesnike bez UUC-a.
4. Alel HLA-DRB1*04:02 i haplotip HLA-B*18~DRB1*11 pokazali su pozitivnu povezanost s UUC-om među EN bolesnicima te pojavom bolesti prije 65. godine života.
5. Među EN bolesnicima kod kojih se bolest razvila nakon 65. godine života haplotip HLA-B*44~DRB1*16 pokazao se kao najrizičniji genetski čimbenik.
6. U skupini EN bolesnika koji su živjeli kraće od 5 godina od postavljanja dijagnoze rizični HLA čimbenici bili su alel HLA-DRB1*04:02 te haplotipovi HLA-B*44~DRB1*16 i HLA-A*26:01~B*38:01~DRB1*04:02, dok je rizični čimbenik među EN bolesnicima koji su živjeli duže od 5 godina bio haplotip HLA-B*18~DRB1*11.

8. SUMMARY

Title: The association of HLA region with endemic nephropathy and upper tract urothelial carcinoma in Croatia

Name: Damir Dittrich

Endemic nephropathy (EN) is a chronic tubulointerstitial kidney disease in which upper urothelial carcinoma (UUC) often occurs. The immune response and HLA genes have been linked with a number of diseases. Aim of this study was to analyze genes, alleles and haplotypes of HLA-A, -B and -DRB1 loci among EN patients (N=111; 52 patients with UUC and 59 patients without UUC) in order to investigate their possible role in EN etiology. In addition, analysis included 52 healthy relatives and 190 healthy unrelated individuals. HLA gene polymorphisms were determined by polymerase chain reaction methods in combination with oligonucleotides specific for HLA gene groups (PCR-SSO) or primers of specific sequences (PCR-SSP). Significant differences in distribution of several HLA alleles between EN patients and healthy controls were detected. The HLA-A*01:01, B*57:01 and B*27:05 alleles were significantly less present, while HLA-DRB1*04:02 allele appeared significantly more frequently among EN patients. Positive correlation with the onset of EN and UUC was determined for HLA-B*18~DRB1*11 and HLA-B*44~DRB1*16 haplotypes, and HLA-A*26:01~B*38:01~DRB1*04:02 extended haplotype. Differences in distribution of alleles and haplotypes were also detected in correlation to age of disease onset and survival. Obtained data demonstrate that investigated HLA loci could be potential susceptibility/protection genetic markers for disease development.

9. SAŽETAK

Naslov: Povezanost regije HLA s endemskom nefropatijom i karcinomom urotela gornjega urotakta u Hrvatskoj

Endemska nefropatija (EN) je kronična tubulointersticijska bolest bubrega kod koje se često javlja karcinom urotela gornjega urotakta (UUC). Imunološki odgovor, u kojem ključnu ulogu imaju geni HLA, povezan je s nastankom brojnih bolesti. Cilj ovog rada bio je istražiti polimorfizam gena, alela i haplotipova lokusa HLA-A, -B i -DRB1 u skupini nesrodnih EN bolesnika (N=111; 52 bolesnika s UUC i 59 bolesnika bez UUC) u svrhu otkrivanja njihove moguće povezanosti s EN. Ispitana su i 52 zdrava srodnika i 190 zdravih nesrodnih osoba. Za određivanje polimorfizma HLA koristila se metoda lančane reakcije polimerazom u kombinaciji s oligonukleotidima specifičnih sekvenci (PCR-SSO) ili početnicama specifičnih sekvenci (PCR-SSP). Otkrivene su značajne razlike u zastupljenosti pojedinih alela HLA između skupine EN bolesnika i zdrave kontrole. U skupini EN bolesnika aleli HLA-A*01:01, B*57:01 i B*27:05 su bili značajno manje zastupljeni, dok je alel HLA-DRB1*04:02 bio značajno češće prisutan. Pozitivna povezanost s pojavom EN i UUC utvrđena je za haplotipove: HLA-B*18~DRB1*11 i HLA-B*44~DRB1*16 kao i produženi haplotip HLA-A*26:01~B*38:01~DRB1*04:02. Otkrivene su razlike u raspodjeli alela i haplotipova HLA s obzirom na dob pojave bolesti, kao i na preživljenje. Dobiveni rezultati ukazuju da su pojedini aleli i haplotipovi HLA potencijalno podložni, odnosno zaštitni genetski čimbenici za razvoj bolesti.

10. LITERATURA

1. Čeović S, Miletić-Medved M. Epidemiological features of endemic nephropathy in focal area of Brodska Posavina, Croatia. U: Čvorišćec D, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A. (ur.) Endemic nephropathy in Croatia. Zagreb: Academia Croatica Scientiarum Medicarum; 1996:7-23.
2. Miletić-Medved M. Prevalence of endemic nephropathy and urothelial cancers in Croatia. Coll Antropol 2006;30 (suppl.1):43.
3. Pichler O, Bobinac E, Miljuš B, Sindik A. Growing occurrence of kidney injuries in the district of Slavonski Brod. Liječ Vjesn 1959;81:295-306.
4. Čeović S, Miletić-Medved M. Epidemiological features of endemic nephropathy in focal area of Brodska Posavina, Croatia. U: Čvorišćec D, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A. (ur.) Endemic nephropathy in Croatia. Zagreb: Academia Croatica Scientiarum Medicarum; 1996:7-21.
5. Čeović S, Pleština R, Miletić-Medved M, Stavljenić A, Mitar J, Vukelić M. Epidemiological aspects of Balkan endemic nephropathy in a typical focus in Yugoslavia. IARC Sci Publ 1991;115:5-10.
6. Miletić-Medved M, Domijan AM, Peraica M. Recent data on endemic nephropathy and related urothelial tumors in Croatia. Wien Klin Wochenschr 2005;117(17):604-9.
7. Čvorišćec D, Čeović S, Borso G, Rukavina AS. Endemic nephropathy in Croatia. Clin Chem Lab Med. 1998;36(5):271-7.
8. Čeović S, Hrabar A, Saric M. Epidemiology of Balkan endemic nephropathy. Food Chem Toxicol 1992;30(3):183-8.
9. Čeović S, Hrabar A, Radonić M. Proširenost, učestalost i druge epidemiološke značajke balkanske endemske nefropatije u Brodskoj posavini. Anali Zavoda Jugoslav Akad 1985;4:373-85.
10. Cvitković A, Vuković-Lela I, Edwards KL, Karanović S, Jurić D, Čvorišćec D, Fuček M, Jelaković B. Could disappearance of endemic (Balkan) nephropathy be expected in forthcoming decades? Kidney Blood Press Res 2012;35(3):147-52.
11. Radovanović Z. Epidemiological characteristics of Balkan endemic nephropathy in eastern regions of Yugoslavia. IARC Sci Publ 1991;115:21-8.

12. Sostaric B, Vukelic M. Characteristics of urinary tract tumours in the area of Balkan endemic nephropathy in Croatia. *IARC Sci Publ* 1991;115:29-35.
13. Sauter G, Algaba F, Amin M, Busch C, Chevillet JC, Gasser T, et al. Tumors of the urinary system. In: Eble JN, Sauter G, Epstein J, Sesterhenn I. (ed.) *World Health Organisation classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs*. Lyon: IARC Press; 2004:110-23.
14. Belicza M, Dubravić A, Leniček T, Pavić I, Tomić K, Jakovina K, Vukelić M, Jakovina T, Mišić M, Krušlin B. Comparison of upper urinary tract carcinomas in Brodsko-posavska endemic nephropathy region with those in the pathoanatomical registry of Sestre milosrdnice University hospital in Zagreb. *Coll Antropol* 2006;30(suppl 1):68.
15. Petronić VJ, Bukurov NS, Djokić MR, Milenković DZ, Vuksanović AM, Avramović AD, Nale DP. Balkan endemic nephropathy and papillary transitional cell tumors of the renal pelvis and ureters. *Kidney Int Suppl* 1991;34:S77-9.
16. Cvitković A, Ivić-Hofman I, Jurić D. Upper urothelium carcinomas in Croatian endemic area. *Wien Klin Wochenschr* 2013;125(17-18):529-36.
17. Tatu CA, Orem WH, Finkelman RB, Feder GL. The Etiology of Balkan Endemic Nephropathy: Still More Questions than Answers. *Environ Health Perspect* 1998;106:689-700.
18. Stefanović V, Toncheva D, Atanasova S, Polenaković M. Etiology of Balkan Endemic Nephropathy and Associated Urothelial Cancer. *Am J Nephrol* 2006;26:1-11.
19. Voice TC, Long DT, Radovanović Z, Atkins JL, McElmurry SP, Niagolova ND, Dimitrov P, Petropoulos EA, Ganey VS. Critical evaluation of environmental exposure agents suspected in the etiology of Balkan endemic nephropathy. *Int J Occup Environ Health* 2006;12:369-76.
20. Huff JE. Carcinogenicity of ochratoxin A in experimental animals. *IARC Sci Publ* 1991;115:229-44.
21. Krogh P. Mycotoxic porcine nephropathy: A possible model for Balkan endemic nephropathy. In: Puhlev A. (ed.) *Endemic Nephropathy*. Sofia: Publishing House of the Bulgarian Academy of Science; 1974:266-70.

22. Turesky RJ. Perspective: Ochratoxin A is not a genotoxic carcinogen. *Chem Res Toxicol* 2005;18:1082-90.
23. Jelaković B, Karanović S, Vuković-Lela I, Miller F, Edwards KL, Nikolić J, Tomić K, Slade N, Brdar B, Turesky RJ, Stipančić Ž, Dittrich D, Grollman AP, Dickman KG. Aristolactam-DNA adducts are a biomarker of environmental exposure to aristolochic acid. *Kidney Int* 2012;81:559-67.
24. Schmeiser HH, Kucab JE, Arlt VM, Phillips DH, Hollstein M, Gluhovschi G, Gluhovschi C, Modilca M, Daminescu L, Petrica L, Velcirov S. Evidence of exposure to aristolochic acid in patients with urothelial cancer from a Balkan endemic nephropathy region of Romani. *Environ Mol Mutagen* 2012;53(8):636-41.
25. Long DT, Voice TC. Role of exposure analysis in solving the mystery of Balkan endemic nephropathy. *Croat Med J* 2007;48(3):300-11.
26. Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, Abramowicz D, Dratwa M, Jadoul M, Richard C, Vandervelde D, Verbeelen D, Vanhaelen-Fastre R. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 1993;341:387-91.
27. Nortier JL, Vanherweghem. For patients taking herbal therapy – lessons from aristolochic acid nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:1512-7.
28. Nortier J, Pozdzik A, Roumeguere T, Vanherweghem JL. Aristolochic acid nephropathy ("Chinese herb nephropathy") *Nephrol Ther* 2015;11(7):574-88.
29. Arlt VM, Alunni-Perret V, Quatrehomme G, Ohayon P, Albano L, Gaid H, Michiels JF, Meyrier A, Cassuto E, Wiessler M, Schmeiser HH, Cosyns JP. Aristolochic acid (AA)-DNA adduct as marker of AA exposure and risk factor for AA nephropathy-associated cancer. *Int J Cancer* 2004;111(6):977-80.
30. Voice TC, Long DT, Radovanović Z, Atkins JL, McElmurry SP, Niagolova ND et al. Critical evaluation of environmental exposure agents suspected in the etiology of Balkan endemic nephropathy. *Int J Occup Environ Health* 2006;12(4):369-76.
31. Schmeiser HH, Nortier JL, Singh R, da Costa GG, Sennesael J, Cassuto-Viguier E et al. Exceptionally long-term persistence of DNA adducts formed by carcinogenic aristolochic acid in renal tissue from patients with aristolochic acid nephropathy. *Int J Cancer* 2014;135(2):502-7.

32. Grollman AP, Shibutani S, Moriya M, Miller F, Wu L, Moll U et al. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:12129–34.
33. D, Mihailova-Hristova M, Vazharova R, Staneva R, Karachanak S, Dimitrov P et al. NGS Nominated *CELA1*, *HSPG2*, and *KCNK5* as Candidate Genes for Predisposition to Balkan Endemic Nephropathy. *Biomed Res Int* 2014;2014:920723.
34. Mathieu R, Bensalah K, Lucca I, Mbeutcha A, Rouprêt M, Shariat SF. Upper urinary tract disease: what we know today and unmet needs. *Transl Androl Urol* 2015;4(3):261-72.
35. Radonić M, Stavljenić A, Čvorišćec D. Kliničke značajke i dijagnostika endemske (balkanske) nefropatije. *Med Vjesn* 1988; 20(2):59-62.
36. Jelaković B, Nikolić J, Radovanović Z et al. Consensus statement on screening, diagnosis, classification and treatment of endemic (Balkan) nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29:2020-7.
37. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Bladder Cancer, including upper tract tumors and urothelial carcinoma of the prostate; 2013. V.I. Available at: www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/bladder.pdf
38. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10-29.
39. Ding T, Zheng Z, Xu R, Zhou C. Prognostic factors and outcomes of primary transitional cell carcinoma of the ureter: a population-based study. *Oncotarget* 2017;8(39):65983-96.
40. Shariat SF, Favaretto RL, Gupta A, Fritsche HM, Matsumoto K, Kassouf W et al. Gender differences in radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma. *World J Urol*. 2011;29:481-6.
41. Therkildsen C, Eriksson P, Höglund M, Jönsson M, Sjö Dahl G, Nilbert M, Liedberg F. Molecular subtype classification of urothelial carcinoma in Lynch syndrome. *Mol Oncol* 2018;12(8):1286-95.
42. Rouprêt M, Fromont G, Azzouzi AR, Catto JW, Valancien G, Hamdy FC, Cussenot O. Microsatellite instability as predictor of survival in patients with invasive upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology* 2005;65:1233-7.

43. Colin P, Koenig P, Ouzzane A, Berthon N, Villers A, Biserte et al. Environmental factors involved in carcinogenesis of urothelial cell carcinomas of the upper urinary tract. *BJU Int* 2009;104:1436-40.
44. Grollman AP, Shibutani S, Moriya M, Miller F, Wu L, Moll U et al. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(29):12129-34.
45. Rink M, Robinson BD, Green DA, Cha EK, Hansen J, Compoj E et al. Impact of histological variants on clinical outcomes of patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. *J Urol* 2012;188(2):398-404.
46. Zamboni S, Foerster B, Abufaraj M, Seisen T, Roupret M, Colin P et al. Incidence and survival outcomes in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma diagnosed with variant histology and treated with nephroureterectomy. *BJU Int* 2019;124(5):738-45.
47. Orsola A, Trias I, Raventós CX, Español I, Cecchini L, Orsola I. Renal collecting (Bellini) duct carcinoma displays similar characteristics to upper tract urothelial cell carcinoma. *Urology* 2005;65(1):49-54.
48. Zhou Q. Classification of urological tumors in WHO (2004) and related progress. *J Clin Exp Pathol* 2005;21(5):520-4.
49. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE . (eds.) WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 4th ed. Lyon: IARC Publications; 2016.
50. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs-part A: renal, penile, and testicular tumours. *Eur Urol* 2016;70:93-105.
51. Roupret M, Babjuk M, Comperat E, et al. European Association of Urology guidelines on upper urinary tract urothelial cell carcinoma: 2015 update. *Eur Urol* 2015;68:868–79.
52. Cowan NC, Turney BW, Taylor NJ, McCarthy CL, Crew JP. Multidetector computed tomography urography for diagnosing upper urinary tract tumour. *BJU Int* 2007;99(6):1363-70.
53. Bafaraj SM. Value of Magnetic Resonance Urography Versus Computerized Tomography Urography (CTU) in Evaluation of Obstructive Uropathy: An Observational Study. *Curr Med Imaging Rev* 2018;14(1):129-34.

54. Rojas CP, Castle SM, Llanos CA, et al. Low biopsy volume in ureteroscopy does not affect tumor biopsy grading in upper tract urothelial carcinoma. *Urol Oncol* 2013;31:1696–700.
55. Lughezzani G, Burger M, Margulis V, Matin SF, Novara G, Roupret M et al. Prognostic factors in upper urinary tract urothelial carcinomas: a comprehensive review of the current literature. *Eur Urol* 2012;62(1):100-14.
56. Xylinas E, Kluth L, Mangal S, Roupret M, Karakiewicz PI, Shariat SF. Predictive tools for clinical decision-making and counseling of patients with upper tract urothelial carcinoma. *World J Urol* 2013;31(1):31-6.
57. Favaretto RL, Shariat SF, Savage C, Godoy G, Chade DC, Kaag M et al. Combining imaging and ureteroscopy variables in a preoperative multivariable model for prediction of muscle-invasive and non-organ confined disease in patients with upper tract urothelial carcinoma. *BJU Int* 2012;109(1):77-82.
58. Raman JD, Messer J, Sielatycki JA, Hollenceak CS. Incidence and survival of patients with carcinoma of the ureter and renal pelvis in the USA, 1973–2005. *BJU Int* 2011;107(7):1059-64.
59. Williams AK, Kassouf W, Chin J, Rendon R, Jacobsen N, Fairey A et al. Multifocality rather than tumor location is a prognostic factor in upper tract urothelial carcinoma. *Urol Oncol* 2013;31(7):1161-5.
60. Lee JN, Kwon SY, Choi G-S, Kim HT, Kim T-H, Kwon TG, Kim BW. Impact of surgical wait time on oncologic outcomes in upper urinary tract urothelial carcinoma. *J Surg Oncol* 2014;110:468-75.
61. Kikuchi E, Margulis V, Karakiewicz PI, Roscigno M, Mikami S, Lotan Y et al. Lymphovascular invasion predicts clinical outcomes in patients with node-negative upper tract urothelial carcinoma. *J Clin Oncol* 2009;27(4):612-8.
62. Rink M, Xylinas E, Margulis V, Cha EK, Ehdaie B, Raman JD et al. Impact of smoking on oncologic outcomes of upper tract urothelial carcinoma after radical nephroureterectomy. *Eur Urol* 2013;63(6):1082-90.
63. Zigeuner R, Shariat SF, Margulis V, Karakiewicz PI, Roscigno M, Weizer A et al. Tumour necrosis is an indicator of aggressive biology in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *Eur Urol* 2010;57(4):575-81.
64. Yafi FA, Novara G, Shariat SF, Gupta A, Matsumoto K, Walton TJ et al. Impact of tumour location versus multifocality in patients with upper tract

- urothelial carcinoma treated with nephroureterectomy and bladder cuff excision: a homogeneous series without perioperative chemotherapy. *BJU Int* 2012;110:E7-E13.
65. Colin P, Koenig P, Ouzzane A, Berthon N, Villers A, Biserte J, Rouprêt M. Environmental factors involved in carcinogenesis of urothelial cell carcinomas of the upper urinary tract. *BJU Int* 2009;104:1436-40.
 66. McLaughlin JK, Silverman DT, Hsing AW, Ross RK, Schoenberg JB, Yu MC et al. Cigarette smoking and cancers of the renal pelvis and ureter. *Cancer Res* 1992;52(2):254-7.
 67. Margulis V, Shariat SF, Matin SF, Kamat AM, Zigeuner R, Kikuchi E et al. Outcomes of radical nephroureterectomy: a series from the Upper Tract Urothelial Carcinoma Collaboration. *Cancer* 2009;115:1224-33.
 68. Yang D, Chen Q, Song X, Wang J, Che X, Zhu Z et al. Effect of lymph node dissection on the outcomes of upper tract urothelial carcinomas: a meta-analysis. *Expert Rev Anticancer Ther* 2014;14(6):667-75.
 69. Roscigno M, Brausi M, Heidenreich A, Lotan Y, Margulis V, Shariat SF et al. Lymphadenectomy at the Time of Nephroureterectomy for Upper Tract Urothelial Cancer. *Eur Urol* 2011;66(4):776-83.
 70. Rouprêt M, Babjuk M, Compérat E, Zigeuner R, Sylvester RJ, Burger M et al. European Association of Urology Guidelines on Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma: 2017 Update. *Eur Urol* 2018;73(1):111-22.
 71. Vassilakopoulou M, Rouge TM, Colin P, Ouzzane A, Khayat D, Dimopoulos M-E et al. Outcomes after adjuvant chemotherapy in the treatment of high-risk urothelial carcinoma of the upper urinary tract (UUT-UC): results from a large multicenter collaborative study. *Cancer* 2011;117(24):5500-8.
 72. Fromont G, Rouprêt M, Amira N, Sibony M, Vallancien G, Validire P, Cussenot O. Tissue Microarray Analysis of the Prognostic Value of E-Cadherin, Ki67, p53, p27, Survivin and MSH2 Expression in Upper Urinary Tract Transitional Cell Carcinoma. *Eur Urol* 2005;48(5):764-70.
 73. Missaoui N, Bdioui A, Baccouche A, Belkacem O, Hmida W, Mokni M, Hmissa S. Significance of p53, p27, Ki-67, E-cadherin, and HER2 expression in upper urinary tract urothelial carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst* 2020;32(1):36.

74. dos Reis ST, Moreira Leite KR, Neto AM, Júnior JP, Viana NJ, Antunes AA et al. Immune expression of E-cadherin and α , β and γ -Catenin adhesion molecules and prognosis for upper urinary tract urothelial carcinomas. *Int Braz J Urol* 2012;38(4):466-73.
75. Jankovic Velickovic LJ, Dolicanin Z, Stefanovic V. Endemic nephropathy and upper urothelial carcinoma--new insights in molecular biology. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)* 2014;35(1):57-64.
76. Cheng C-W, Tsai Y-S, Jou Y-C, Tsai H-T, Yang W-H, Chow N-C, Tzai T-S. Prognostic relevance of ron expression on upper tracturothelial carcinoma. *Urol Sci* 2016;27:S44.
77. Comp erat E, Roupret M, Chartier-Kastler E, Bitker MO, Richard F, Camparo P et al. Prognostic Value of MET, RON and Histoprognostic Factors for Urothelial Carcinoma in the Upper Urinary Tract. *J Urol* 2008;179(3):868-72.
78. Wang M-H, Zhang R, Zhou Y-Q, Yao H-P. Pathogenesis of RON receptor tyrosine kinase in cancer cells: activation mechanism, functional crosstalk, and signaling addiction. *J Biomed Res* 2013;27(5):345-56.
79. Gadzinski AJ, Roberts WW, Faerber GJ, Wolf JS Jr. Long-term outcomes of immediate versus delayed nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma. *J Endourol* 2012;26(5):566-73.
80. Yakoubi R, Colin P, Seisen T, L eon P, Nison L, Bozzini G et al. Radical nephroureterectomy versus endoscopic procedures for the treatment of localised upper tract urothelial carcinoma: a meta-analysis and a systematic review of current evidence from comparative studies. *Eur J Surg Oncol* 2014;40:1629-34.
81. Margulis V, Shariat SF, Matin SF, Kamat AM, Zigeuner R, Kikuchi E et al. Outcomes of radical nephroureterectomy: a series from the Upper Tract Urothelial Carcinoma Collaboration. *Cancer* 2009;115:1224-33.
82. Adibi M, Youssef R, Shariat SF, Lotan Y, Wood CG, Sagalowsky AI et al. Oncological outcomes after radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma: Comparison over the three decades. *Int J Urol* 2012;19(12):1060-6.
83. AJ, Chester JD, Jones RJ, Johnson M, Hill M, Bryan RT et al. Results of POUT: A phase III randomised trial of perioperative chemotherapy versus

- surveillance in upper tract urothelial cancer (UTUC). *J Clin Oncol* 2018;36(suppl.):407.
84. Margulis V, Shariat SF, Matin SF, Kamat AM, Zigeuner R, Kikuchi E et al. Outcomes of radical nephroureterectomy: a series from the Upper Tract Urothelial Carcinoma Collaboration. *Cancer* 2009;115:1224-33.
 85. Vassilakopoulou M, Rouge TM, Colin P, Ouzzane A, Khayat D, Dimopoulos M-E et al. Outcomes after adjuvant chemotherapy in the treatment of high-risk urothelial carcinoma of the upper urinary tract (UUT-UC): results from a large multicenter collaborative study. *Cancer* 2011;117(24):5500-8.
 86. Leow JJ, Martin-Doyle W, Fay AP, Choueiri TK, Chang SL, Bellmunt J. A systematic review and meta-analysis of adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for upper tract urothelial carcinoma. *Eur Urol* 2014;66(3):529-41.
 87. Leow JJ, Chong YL, Chang SL, Valderrama BP, Powles T, Bellmunt J. Neoadjuvant and Adjuvant Chemotherapy for Upper Tract Urothelial Carcinoma: A 2020 Systematic Review and Meta-analysis, and Future Perspectives on Systemic Therapy. *Eur Urol* 2020; Aug 12;S0302-2838(20)30532-7. doi: 10.1016/j.eururo.2020.07.003.
 88. Hosogoe S, Hatakeyama S, Kusaka A, Hamano I, Iwamura H, Fujita N et al. Platinum-based Neoadjuvant Chemotherapy Improves Oncological Outcomes in Patients with Locally Advanced Upper Tract Urothelial Carcinoma. *Eur Urol Focus* 2018;4(6):946-53.
 89. Fang D, Li XS, Xiong GY, Yao L, He ZS, Zhou LQ. Prophylactic intravesical chemotherapy to prevent bladder tumors after nephroureterectomy for primary upper urinary tract urothelial carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Urol Int* 2013;91: 291–6.
 90. Ito A, Shintaku I, Satoh M, Ioritani N, Aizawa M, Tochigi T et al. Prospective randomized phase II trial of a single early intravesical instillation of pirarubicin (THP) in the prevention of bladder recurrence after nephroureterectomy for upper urinary tract urothelial carcinoma: the THP Monotherapy Study Group Trial. *J Clin Oncol* 2013;31:1422–7.
 91. Mehra NK. *The HLA Complex in Biology and Medicine: A Resource Book*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd.; 2010.

92. Williams TM. Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. *J Mol Diagn* 2001;3:98-104.
93. Corzi D, Salazar M, Granja CB, Yunis EJ. Advances in HLA genetics. *Exp Clin Immunogenet* 1995;12(3):156-70.
94. Janeway CA, Travers P. (eds) Antigen recognition by T lymphocytes. New York: Garland Publishing; 1997:41-6.
95. Volpi EV, Chevret E, Jones T, Vatcheva R, Williamson J, Beck S et al. Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J Cell Sci* 2000; 113:1565-76.
96. Kindt TJ, Osborne B.A, Goldsby RA. (eds) *Kuby Immunology*. New York: Freeman, W.H.&Company; 2006.
97. Little AM, Parham P. Polymorphism and evolution of Class I and II genes and molecules. *Rev Immunogenet* 1999;1(1):105-23.
98. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. New York: Garland Science; 2001.
99. Mehra NK. The HLA genes and their diverse polymorphism. *Indian J Clin Biochem* 2000; 15(Suppl 1): 65-77.
100. Martin M, Mann D, Carrington M. Recombination rates across the HLA complex: use of microsatellites as a rapid screen for recombinant chromosomes. *Hum Mol Genet* 1995;4(3):423-8.
101. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M i sur. *Imunologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
102. Marsh SG, Bodmer JG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2000. *Tissue Antigens* 2001; 57(3): 236-83.
103. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. New York: Garland Science; 2005: p88-91, p183-214, p379-82.
104. Cruz-Tapias P, Castiblanco J, Anaya JM. Chapter 10. Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation. In: Anaya JM et al. (eds.) *Autoimmunity*. Bogota: El Rosario University Press; 2013.

105. Ueda R, Shiku H, Pfreundschuh M, Takahashi T, Li LT, Whitmore WF et al. Cell surface antigens of human renal cancer defined by autologous typing. *J Exp Med* 1979;150:564–79.
106. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3:991-8.
107. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
108. Prendergast GC. Immune escape as a fundamental trait of cancer: Focus on IDO. *Oncogene* 2008;27:3889-900.
109. Kamiza AB, Kamiza S, Mathew CG. HLA-DRB1 alleles and cervical cancer: A meta-analysis of 36 case-control studies. *Cancer Epidemiol* 2020;67:101748.
110. Yao K, Yang S, Shen J, Zhang R, Li L. HLA-DRB1 allele polymorphism and nasopharyngeal carcinoma risk: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2017;274(1):297-303.
111. Ramanathan AS, Senguttuvan P, Chinniah R, Vijayan M, Thirunavukkarasu M, Raju K et al. Association of HLA-DR/DQ alleles and haplotypes with nephrotic syndrome. *Nephrology (Carlton)* 2016;21(9):745-52.
112. Stokidis S, Fortis SP, Kogionou P, Anagnostou T, Perez SA, Baxevanis CN. HLA Class I Allele Expression and Clinical Outcome in De Novo Metastatic Prostate Cancer. *Cancers (Basel)* 2020;12(6):1623
113. Masucci GV, Andersson E, Villabona L, Helgadottir H, Bergfeldt K, Cavallo F et al. Survival of the fittest or best adapted: HLA-dependent tumor development. *J Nucleic Acids Invest* 2010;1(1):e9.
114. Villabona L. HLA-A*02 and its prognostic traits in cancer: an immunological biomarker as a tool towards individualised cancer therapy. Thesis. Stockholm: Karolinska University Hospital; 2016. Available at: https://openarchive.ki.se/xmlui/bitstream/handle/10616/44973/Thesis_Lisa_Villabona.pdf?sequence=1&isAllowed=y
115. Mimura K, Shiraishi K, Mueller A, Izawa S, Kua L-F, So J et al. The MAPK Pathway is a Predominant Regulator of HLA-A Expression in Esophageal and Gastric Cancer. *J Immunol* 2013;191:6261-72.
116. Leffers N, Lambeck AJA, Graeff P, Bijlsma AY, Daemen T, van derZee AG, Nijman HW. Survival of ovarian cancer patients overexpressing the tumour

- antigen p53 is diminished in case of MHC class I down-regulation. *Gynecol Oncol* 2008;110:365-73.
117. Watson NFS, Ramage JM, Madjd Z, Spendlove I, Ellis IO, Scholefield JH, Durrant LG. 2006. Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I ex-pression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer* 2006;118:6-10.
 118. Nie Y, Yang G, Song Y, Zhao X, So C, Liao J et al. DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLAclass I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 2001;22:1615-23.
 119. Seliger B. Molecular mechanisms of MHC class I abnormalities and APMcomponents in human tumors. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:1719-26.
 120. Jiménez P, Cantón J, Collado A, Cabrera T, Serrano A, Real LM et al. Chromosome loss is the mostfrequent mechanism contributing to HLA haplotype loss in human tumors. *Int J Cancer* 1999;83:91-7.
 121. van Endert P. Molecular Immunology. In: Ratcliffe MJH. *Encyclopedia of Immunobiology*. London: Academic Press; 2016.
 122. Sabbatino F, Liguori L, Polcaro G, Salvato I, Caramori G, Salzano FA. Role of Human Leukocyte Antigen System as a Predictive Biomarker for Checkpoint-Based Immunotherapy in Cancer Patients. *Int J Mol Sci* 2020;21(19):7295.
 123. Gorenjak M. Kidneys and Autoimmune Disease. *EJIFCC* 2009;20(1):28-32.
 124. Kettritz R. Autoimmunity in kidney diseases. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2008;241:99-103.
 125. Ooi JD, Petersen J, Tan YH, Huynh M, Willett ZJ, Ramarathinam SH. Dominant protection from HLA-linked autoimmunity by antigen-specific regulatory T cells. *Nature* 2017;545(7653):243-7.
 126. Phelps RG, Rees AJ. The HLA complex in Goodpasture's disease: a model for analyzing susceptibility to autoimmunity. *Kidney Int* 1999;56:1638-53.
 127. Robson KJ, Ooi JD, Holdsworth SR, Rossjohn J, Kitching AR. HLA and kidney disease: from associations to mechanisms. *Nat Rev Nephrol* 2018;14:636-55.

128. Ooi JD, Petersen J, Tan YH, Huynh M, Willett ZJ, Ramarathinam SH. Dominant protection from HLA-linked autoimmunity by antigen-specific regulatory T cells. *Nature* 2017;545(7653):243-7.
129. Rossjohn J, Gras S, Miles JJ, Turner SJ, Godfrey DI, McCluskey J. T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules *Annu Rev Immunol* 2015;33:169-200.
130. Wucherpfennig KW, Sethi D. T cell Receptor Recognition of Self and Foreign Antigens in the Induction of Autoimmunity *Semin Immunol* 2011;23(2):84-91.
131. Ikizler TA, Burrowes JD, Byham-Gray LD, Campbell KL, Carrero J-J, Chan W et al. KDOQI Clinical Practice Guideline for Nutrition in CKD: 2020 Update. *Am J Kidney Dis* 2020;76(suppl.1):S1-S107.
132. Dunckley H. HLA typing by SSO and SSP methods. *Methods Mol Biol* 2012;882:9-25.
133. Howell WM, Carter V, Clark B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. *J Clin Pathol* 2010;63:387-90.
134. Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Marsh SGE. IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acid Res* 2020;48:D948-55.
135. Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet* 2005;76(3):449-62.
136. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;68(4):978-89.
137. Crux NB, Elahi S. Human Leukocyte Antigen (HLA) and Immune Regulation: How Do Classical and Non-Classical HLA Alleles Modulate Immune Response to Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Infections. *Front Immunol* 2017;8:832.
138. Blackwell JM, Jamieson SE, Burgner D. HLA and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(2):370-85.
139. Mosaad YM. Clinical Role of Human Leukocyte Antigen in Health and Disease. *Scand J Immunol* 2015;82(4):283-306.

140. Minev M, Mikhaylov T, Katelan A, Nyulassy S, Menzel G. HLA System and Balkan Endemic Nephropathy (a collective study with the collaboration of all participants in the HLA Workshop-Sofia 1976). *Tissue Antigens* 1978;11:50-4.
141. Kastelan A, Kerhin-Brkljacic V, Hors J, Brkljacic L, Macasovic P. The distribution of HLA antigens and genes in the Yugoslav population *Tissue Antigens* 1974; 4(1):69-75.
142. Wang M, Li J-S, Ping Y, Li Z-Q, Wang L-P, Guo Q et al. The host HLA-A*02 allele is associated with the response to pegylated interferon and ribavirin in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Arch Virol* 2015;160(4):1043-54.
143. Sanchez-Mazas A, Buhler S, Nunes JM. A New HLA Map of Europe: Regional Genetic Variation and Its Implication for Peopling History, Disease-Association Studies and Tissue Transplantation *Hum Hered* 2013;76:162-77.
144. Robson KJ, Ooi JD, Holdsworth SR, Rossjohn J, Kitching AR. HLA and kidney disease: from associations to mechanisms. *Nat Rev Nephrol* 2018;14(10):636-55.
145. Noureen N, Shah FA, Lisec J, Usman H, Khalid M, Munir R, Zaidi N. Revisiting the association between human leukocyte antigen and end-stage renal disease. *PLoS One* 2020;15(9):e0238878.
146. Dai C-S, Chu C-C, Chen S-F, Sun C-Y, Lin M, Lee C-C. Association between human leucocyte antigen subtypes and risk of end stage renal disease in Taiwanese: a retrospective study. *BMC Nephrol* 2015;16:177.
147. Zhang T, Yang F, Zuo K, Wang J, Cheng Z, Zhang J. HLA-B27 Negativity Is Associated With Renal Function Decline in Patients With Ankylosing Spondylitis and Secondary IgA Nephropathy. *Front Med (Lausanne)* 2020;7:89.
148. Van Drongelen V, Holoshitz J. A reciprocal HLA-Disease Association in Rheumatoid Arthritis and Pemphigus Vulgaris. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2017;22:909-19.
149. Van der Woude D, Lie BA, Lundstrom E, Balsa A, Feitsma AL, Houwing-Duistermaat JJ et al. Protection against anti-citrullinated protein antibody-

- positive rheumatoid arthritis is predominantly associated with HLA-DRB1*1301: a meta-analysis of HLA-DRB1 associations with anticitrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in four European populations. *Arthritis Rheum* 2010; 62:1236-45.
150. Fisher M, Pusey CD, Vaughan RW, Rees AJ. Susceptibility to anti-glomerular basement membrane disease is strongly associated with HLA-DRB1 genes. *Kidney Int* 1997;51(1):222-9.
 151. allelefrequencies.net database - Allele Frequency Net Database. Available at: <http://www.allelefrequencies.net/>
 152. SCL, Simmonds MJ. The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action. *Curr Genomics*. 2007 Nov; 8(7): 453–465.
 153. Trabace S. HLA and disease association. *J Headache Pain* 2000;1:S109-S113.
 154. Kishore A, Petrek M. Next-Generation Sequencing Based HLA Typing: Deciphering Immunogenetic Aspects of Sarcoidosis. *Front Genet* 2018;9:503.
 155. Noureen N, Shah FA, Liseć J, Usman H, Khalid M, Munir R, Zaidi N. Revisiting the association between human leukocyte antigen and end-stage renal disease. *PLoS One* 2020;15(9):e0238878.
 156. Shiina T, Hosomichi K, Ionoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet* 2009; 54:15-39.
 157. Noureen N, Shah FA, Liseć J, Usman H, Khalid M, Munir R, Zaidi N. Revisiting the association between human leukocyte antigen and end-stage renal disease. *PLoS One* 2020;15(9):e0238878.
 158. Bukvić D, Janković S, Marković-Denić LJ. Descriptive and epidemiologic characteristics of patients with malignant upper urothelial tumors in the endemic area of Lazarevac. *Srp Arh Celok Lek* 1999;127(11-12):371-5.
 159. Djokic M, Hadzi-Djokic J, Nikolic J, Dragicevic D, Radivojevic D. Comparison of upper urinary tract tumors in the region of Balkan nephropathy with those of other regions of Yugoslavia. *Prog Urol* 1999;9(1):61-8.

160. Cukuranovic R, Petrovic B, Cukuranovic Z, Stefanović V. Balkan endemic nephropathy: a decreasing incidence of the disease. *Pathol Biol (Paris)* 2000;48(6):558-61.
161. Sostaric B, Vukelic M. Characteristics of urinary tract tumours in the area of Balkan endemic nephropathy in Croatia. *IARC Sci Publ.* 1991(115):29-35
162. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2018. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2020/12/Bilten_2018_final.pdf
163. Petros FG. Epidemiology, clinical presentation, and evaluation of upper-tract urothelial carcinoma. *Transl Androl Urol* 2020;9(4):1794-8.
164. Petros FG. Epidemiology, clinical presentation, and evaluation of upper-tract urothelial carcinoma. *Transl Androl Urol* 2020;9(4):1794-8.
165. Roupret M, Babjuk M, Comperat E, Zigeuner R, Sylvester RJ, Burger M et al. European Association of Urology Guidelines on Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma: 2017 Update. *Eur Urol* 2018;73:111-22.
166. Chang C-W, Ou C-H, Yu C-C, Lo C-W, Tsai C-Y, Cheng P-Y et al. Comparative analysis of patients with upper urinary tract urothelial carcinoma in black-foot disease endemic and non-endemic area. *BMC Cancer* 2021;21(1):80.
167. Miyazaki J, Nishiyama H. Epidemiology of urothelial carcinoma *Int J Urol* 2017;24(10):730-4.
168. Wu J, Chen S, Wu X, Mao W, Wang Y, Xu B et al. Trends of incidence and prognosis of upper tract urothelial carcinoma. *Bosn J Basic Med Sci* 2020 Dec 18. doi: 10.17305/bjbms.2020.5345.
169. Medunjanin D, Sonicki Z, Vena JE, Cvitkovic A, Wagner Robb S. Geographic distribution and risk of upper urothelial carcinomas in Croatia, 2001-2011. *BMC Cancer* 2019;19(1):950.
170. Chen C-H, Dickman KG, Moriya M, Zavadil J, Sidorenko VS, Edwards KL. Aristolochic acid-associated urothelial cancer in Taiwan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(21):8241-6.
171. Belicza M, Demirović A, Tomić K, Lenicek T, Pavić I, Jakovina K et al. Comparison of Occurrence of Upper Urinary Tract Carcinomas in the Region with Endemic Villages and Non-Endemic Nephropathy Region in Croatia. *Coll Antropol* 2008;32(4):1203-7.

172. Shariat SF, Godoy G, Lotan Y, Droller M, Karakiewicz PI, Raman JD et al. Advanced patient age is associated with inferior cancer-specific survival after radical nephroureterectomy. *BJU Int* 2010;105(12):1672-7.
173. Kim HS, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Association between demographic factors and prognosis in urothelial carcinoma of the upper urinary tract: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017 ;8(5):7464-76.
174. Fernández MI, Shariat SF, Margulis V, Bolenz C, Montorsi F, Suardi N et al. Evidence-based sex-related outcomes after radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma: results of large multicenter study. *Urology* 2009;73(1):142-6.
175. Shariat SF, Favaretto RL, Gupta A, Fritsche H-M, Matsumoto K, Kassouf W et al. Gender differences in radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma. *World J Urol.* 2011 Aug;29(4):481-6.
176. Huang C-C, Su Y-L, Luo H-L, Chen Y-T, Sio TT, Hsu H-C, Lai C-H. Gender Is a Significant Prognostic Factor for Upper Tract Urothelial Carcinoma: A Large Hospital-Based Cancer Registry Study in an Endemic Area. *Front Oncol* 2019;9:157.
177. HLA-DQA1 i HLADQB1 geni u pacijenata s celijakijom. Mijandrušić Sinčić B, Starčević Čizmarević N, Licul V, Crnić-Martinović M, Ristić S, Kapović M. *Medicina Fluminensis* 2016;52:87-94.
178. James LM, Georgopoulos AP. The Human Leukocyte Antigen (HLA) DRB1*13:02 Allele Protects against Dementia in Continental Western Europe. *J Neurol Neuromed* 2019;4(5):1-6.
179. Aribi M, Moulessehoul S, Benebadji A-B, Kendoucitani M. HLA DR phenotypic frequencies and genetic risk of Type 1 diabetes in west region of Algeria, Tlemcen. *BMC Genetics* 2004;5:24.
180. El Ansary MM, Mohammed LA, Hassan TH, Baraka A, Ahmed AA. Human leukocyte antigen-DRB1 polymorphism in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Mol Clin Oncol* 2015;3(2):425-9.
181. Lughezzani G, Jeldres C, Ibsarn H, Sun M, Shariat SF, Alasker A et al. Nephroureterectomy and segmental ureterectomy in the treatment of invasive upper tract urothelial carcinoma: a population - based study of 2299 patients. *Eur J Cancer* 2009;45(18):3291-7.

11. ŽIVOTOPIS

Rođen 20.12.1968. godine u Slavonskom Brodu gdje pohađa osnovnu i srednju školu. Po završetku osnovnog i srednjeg obrazovanja upisao smjer inženjera biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu u prvoj generaciji pohađao po šestogodišnjem programu i diplomirao 1999. godine, a iste godine u prosincu započinje pripravnički staž u Općoj bolnici "Dr. Josip Benčević", Slavonski Brod gdje do danas radi.

U siječnju 2001. položio državni ispit, iste godine započeo specijalistički staž iz urologije. Specijalistički ispit je položio 2007. g.

U proteklom razdoblju do danas aktivan na području znanosti posebno vezano za endemsku nefropatiju i pojavnost tumora urotela koji su usko vezani za tu bolest. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu od 2016. g. pohađa znanstveni poslijediplomski studij "Biomedicina i zdravstvo", a od 2018. g. subspecijalist je iz urološke onkologije.

Trenutno je voditelj Odjela za urologiju u Općoj bolnici "Dr. Josip Benčević", Slavonski Brod. Autor je ili koautor preko 20 znanstvenih i stručnih radova, aktivno sudjelovao na međunarodnim kongresima. Član je Hrvatskog urološkog društva, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za transplantacijsku medicinu. Otac dvoje djece.

Popis znanstvenih radova objavljenih u CC časopisima:

1. Dittrich D, Maskalan M, Kastelan Z, Palenkic H, Grubic Z. The role of HLA in Balkan endemic nephropathy. *Gene* 2021;767:145179.
2. Knežević M, Tomić K, Dittrich D, Vuković Lela I, Ružić B, Spajić B, Karlović K, Štimac G. Collecting Duct Carcinoma and Endemic Nephropathy – Case Reports and Literature Review. *Acta Clin Croat* 2020;59:539-42.
3. Castells X, Karanović S, Ardin M, Tomić K, Xylinas E, Durand G, Villar S, Forey N, Le Calvez-Kelm F, Voegelé C, Karlović K, Mišić M, Dittrich D, Dolgalev I, McKay J, Shariat SF, Sidorenko VS, Fernandes A, Heguy A, Dickman KG, Olivier M, Grollman AP, Jelaković B, Zavadil J. Low-Coverage Exome Sequencing Screen in Formalin-Fixed Paraffin-

- Embedded Tumors Reveals Evidence of Exposure to Carcinogenic Aristolochic Acid. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015;24(12):1873-81.
4. Karanović S, Tomić K, Dittrich D, Borovečki F, Zavadil J, Vuković-Lela I, Karlović K, Knežević M, Jelaković B. Endemic (Balkan) nephropathy is aristolochic acid nephropathy. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)* 2014;35(1):43-6.
 5. Karanović S, Vuković Lela I, Jelaković B, Dickman KG, Kovač Peić A, Dittrich D, Knežević M, Matijević V, Fernandes AS, Miller F. Variation in presentation and presence of DNA adducts and p53 mutations in patients with endemic nephropathy – an environmental form of the aristolochic acid nephropathy. *Kidney Blood Press Res* 2013;37:1-8.
 6. Jelaković B, Karanović S, Vuković-Lela I, Miller F, Edwards KL, Nikolić J, Tomić K, Slade N, Brdar B, Turesky RJ, Stipančić Z, Dittrich D, Grollman AP, Dickman KG. Aristolactam-DNA adducts are a biomarker of environmental exposure to aristolochic acid. *Kidney Int* 2012;81(6):559-67.

Kongresna priopćenja

1. Dittrich D, Maskalan M, Kaštelan Ž, Žunec R, Grubić Z. Association of HLA alleles and haplotypes with endemic nephropathy in Croatia. 33rd European Immunogenetics and Histocompatibility Conference. Lisbon, Portugal. 08.-11.05.2019. *HLA* 2019;93(5):395-6.
2. Dittrich D, Maskalan M, Kaštelan Ž, Žunec R, Grubić Z. HLA-A, -B, AND -DRB1 alleles and haplotypes and the risk of endemic nephropathy in Croatians. 13th EAST-WEST IMMUNOGENETICS CONFERENCE, EWIC 2019 - BUILDING BRIDGES. Zagreb, Hrvatska, 14.-16.03.2019. *Abstract Book* 2019:70.
3. Dittrich D, Maskalan M, Žunec R, Kaštelan Ž, Grubić Z. Association of HLA-A,-B and-DRB1 genes with endemic nephropathy and urothelial carcinoma of upper urinary tract in Croatia. 10th European Multidisciplinary Congress on Urological Cancers, Amsterdam, Nizozemska. 08.-11.11.2018. *Eur Urol* 2018;17(14):e2958.

4. Dittrich D, Maskalan M, Žunec R, Kaštelan Ž, Grubić Z. Polymorphism of HLA-DRB1 genes among patients with endemic nephropathy and urothelial carcinoma of upper urinary tract in the Croatian population. International Symposium „Urology Today“. Šibenik, Hrvatska, 22.-30.09.2018. Abstract Book 2018:51-2.
5. Dittrich D, Lučić Đ, Martinović M, Barišić A, Karlović K, Marinčić D, Bošnjak B. Veliki kamenac mokraćnog mjehura: prikaz slučaja. 6. hrvatski urološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem. Poreč, Hrvatska, 12.-15.10.2017. Knjiga sažetaka 2017:62.
6. Dittrich D, Lučić Đ, Martinović M, Barišić A, Karlović K, Marinčić D, Bošnjak B. Dislokacija testisa u politraumatiziranog bolesnika: prikaz slučaja. 6. hrvatski urološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem. Poreč, Hrvatska, 12.-15.10.2017. Knjiga sažetaka 2017:63-4.
7. Dittrich D, Medverec Z, Jakovina T, Jakovina K, Tomić K, Stipanić O, Vuković S, Karanović S, Grollman P, Jelaković B. Endemic nephropathy is aristolochic acid nephropathy: a urological controversy resolved. The 3rd World Congress on Controversies in Urology, Athens, Greece, 25.-28.02.2010. Abstract Book:A7-A8.