



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE AKADEMSKE STUDIJE

**ZNAČAJ DIREKTNOG TESTA UTROŠKA
ANTI HUMANOG GLOBULINA U
IMUNOHEMATOLOGIJI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Svetlana Vojvodić

Kandidat: dr Jasmina Grujić

Novi Sad, 2014.godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Jasmina Grujić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Svetlana Vojvodić
Naslov rada: NR	Značaj direktnog testa utroška antihumanog globulina u imunohematologiji
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Novi Sad, Vojvodina
Godina: GO	2014. godina
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 8 / stranica 118/ slika 16/ grafikona 16) /tabela 30/referenci 208)
Naučna oblast: NO	Medicinske nauke
Naučna disciplina: ND	Interna medicina – Transfuziologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Hematološke bolesti, Imunoglobulin G, Transfuzija krvi, Testovi hemaglutinacije, Antitela, Coombsov test, Prognoza
UDK	616.15-074 615.37/.38
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema

Izvod:
IZ

UVOD: Citopenija je jedna od glavnih karakteristika mnogih hematoloških bolesti. U rutinskoj transfuziološkoj upotrebi su metode detekcije prisustva antitela u serumu ili na eritrocitima bolesnika. Primena direktnog testa utroška antihumanog globulina predstavlja efikasan način da se stekne kompletan uvid u imunološka zbivanja na svim krvnim lozama, prati dinamika razvoja antitela i toka bolesti.

MATERIJAL I METODE:

Svim pacijentima su se iz uzoraka periferne krvi vršile sledeće analize krvi: 1) direktni antiglobulinski test mikrometodom aglutinacije u gel karticama (LISS)/ Coombs ID. Dobijeni rezultat aglutinacije mikrometodom na gelu može biti negativan ili pozitivan i 2) direktni test utroška antihumanog globulina metodom aglutinacije u epruveti. Očitavanje se vršilo određivanjem razlike u titru antihumanog globulina i očitavanjem postojeće reakcije aglutinacije dobijene u uzorcima pacijenta u odnosu na rezultate reakcije aglutinacije dobijene sa uzorcima zdrave kontrolne osobe. Test se smatrao pozitivnim ukoliko se dobijala razlika u titru AHG-a za bar dva razređenja sa pacijentovim ćelijama u odnosu na ćelije zdrave kontrolne osobe. Statistička značajnost je analizirana t-testom, Spirmanovim koeficijentom korelacije.

	<p>REZULTATI: Analizirano je 100 pacijenata sa dijagnozom anemije, leukopenije, limfoproliferativnih bolesti, trombocitopenije, trombotične trombocitopenijske purpore, idiopatske trombocitopenične purpore, mijelodisplastičnog sindroma, miastenije gravis i sistemskog eritematoznog lupusa pre i nakon primljene terapije. Direktni antiglobulinski test je bio pozitivan u 20% slučajeva dok je direktni test utroška antihumanog globulina bio u 51%, odnosno za 31% više. Nakon primljene terapije direktni antiglobulinski test je ostao pozitivan u 18% slučajeva a direktni test utroška antihumanog globulina u 46% što je za 28% više. Utvrđivanjem povezanosti između citopenije i stepena utroška antihumanog globulina dokazano je da svi praćeni parametri utiču na stepen utroška AHG-a: hemoglobin ($\beta=-0,579$, $p=0,000$), hematokrit ($\beta=-0,568$, $p=0,000$), eritrociti ($\beta=-0,519$, $p=0,000$), trombociti ($\beta=-0,617$, $p=0,000$) i leukociti ($\beta=-0,119$, $p=0,237$). Takođe je dokazano da što su vrednosti posmatranih parametara veće, razlika u titru direktnog testa utroška antihumanog globulina je manja što bi išlo u prilog boljoj prognozi posmatranog oboljenja.</p> <p>ZAKLJUČAK: Direktni test utroška antihumanog globulina je značajno osetljiviji test u odnosu na direktni antihumani globulinski test. Postoji pozitivna korelacija između citopenije i stepena konzumacije antihumanog globulina. Smanjenje titra antitela direktnog testa utroška antihumanog globulina je jedan od pokazatelja bolje prognoze bolesti.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	25.03.2014. godine
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: Prof. dr Stevan Popović, redovni profesor, Medicinski fakultet Novi Sad</p> <p>član: Prof. dr Aleksandar Savić, vanredni profesor, Medicinski fakultet Novi Sad</p> <p>član: Prof. dr Nada Konstantinidis, redovni profesor, Medicinski fakultet Novi Sad</p> <p>član: Prof. dr Jovanka Kolarović, vanredni profesor, Medicinski fakultet Novi Sad</p> <p>član: Prof. dr Lana Mačukanović Golubović, redovni profesor, Medicinski fakultet Niš</p>
---	---

University of NoviSad

ACI

MSI

Key word
documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Jasmina Grujić
Mentor: MN	Proffessor Svetlana Vojvodić, PhD
Title: TI	The importance of direct consumption test of anti-human globulin in immunohematology
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Novi Sad, Vojvodina
Publication year: PY	2014. year
Publisher: PU	Authors reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	(number of chapters 8/pages 118/pictures 16 /graphs 16/tables 30/references 208)
Scientific field SF	Medical science
Scientific discipline SD	Interne medicine – Transfusiology
Subject, Key words SKW	Hematologic Diseases, Immunoglobulin G, Blood Transfusion, Hemagglutination Tests, Antibodies, Coombs Test, Prognosis
UC	616.15-074 615.37/.38
Holding data: HD	Library of Medical Faculty, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Note: N	None

Abstract:
AB

INTRODUCTION: Cytopenia is one of the main characteristics of many hematologic diseases. In routine use are methods of detecting the presence of antibodies in the serum or on red blood cells of patients. The application of direct consumption test of antihuman globulin is an efficient way to gain complete insight into the immunological events at all bloodlines, monitor the dynamics of the development of antibodies and disease progression.

MATERIALS AND METHODS: All patients samples were tested for: 1) direct antiglobulin test by micro agglutination method in the gel card (LISS) / Coombs ID. The result obtained by micro agglutination gel can be negative or positive, 2) direct consumption test of antihuman globulin in a test tube. Interpretation is performed by determining differences in titer of antihuman globulin by reading existing reactions of agglutination in samples of the patient and compare it to the results obtained with the samples of the healthy control persons. The test is considered positive if the difference in titres obtained AHG differs for at least two dilutions of a patient's cells compared to cells of healthy control persons. Statistical significance was analyzed by t-test, Spearman correlation coefficient.

RESULTS: A total of 100 patients diagnosed with anemia, leukopenia, lymphoproliferative disease, thrombocytopenia, thrombotic thrombocytopenic purpura, idiopathic thrombocytopenic purpura, myelodysplastic syndrome, myasthenia gravis and systemic lupus erythematosus were analyzed before and after receiving treatment. Direct antiglobulin test was positive in 20% cases, while the direct consumption test of anti-human globulin was 51%, that is the difference of 31%. After treatment direct antiglobulin test remained positive in 18% of cases and direct consumption test of antihuman globulin was in 46%, which is 28% higher. Determining the relationship between the degree of cytopenia and consumption of anti-human globulin showed that all monitored parameters affect the level of consumption: hemoglobin ($\beta = -0.579$, $p = 0.000$), hematocrit ($\beta = -0.568$, $p = 0.000$), erythrocytes ($\beta = -0.519$, $p = 0.000$), platelets ($\beta = -0.617$, $p = 0.000$) and leukocytes ($\beta = -0.119$, $p = 0.237$). It was also proved that if the values of observed parameters are higher, difference in titer of direct consumption test of antihuman globulin is lower, which can indicate better prognosis of disease.

CONCLUSION: Direct consumption test of antihuman globulin was significantly more sensitive test than the direct anti-human globulin test. There is a positive correlation between the degree of cytopenia and consumption of anti-human globulin. Decrease in antibody titer in direct consumption test of antihuman globulin is an indicator of a better prognosis of the disease.

Accepted on Scientific Board on: AS	25.03.2014. year
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>President: Prof. dr Stevan Popović, PhD, full-time professor, Medical faculty Novi Sad</p> <p>Member: Prof. dr Aleksandar Savić, PhD, part-time professor, Medical faculty Novi Sad</p> <p>Member: Prof. dr Nada Konstantinidis, PhD, full-time professor, Medical faculty Novi Sad</p> <p>Member: Prof. dr Jovanka Kolarović, PhD, part-time professor, Medical faculty Novi Sad</p> <p>Member: Prof. dr Lana Mačukanović Golubović, PhD, full-time professor, Medical faculty Niš</p>

SADRŽAJ

SKRAĆENICE:	1
UVOD	2
1.1 IMUNI SISTEM	2
1.1.1 Definicija	2
1.1.2 Klasifikacija	2
1.1.3 Organi i tkiva imunog sistema.....	4
1.1.3.1 Podela limfnih organa.....	4
1.1.4 Poremećaji	5
1.1.5 Antitela	5
1.1.6 Aglutinacija eritrocita	8
1.1.7 Direktan antiglobulinski test i direktni test utroška antihumanog globulina.....	10
1.2 IMUNOHEMATOLOŠKE BOLESTI	14
1.2.1 Limfoproliferativna oboljenja	15
1.2.1.1 Hronična limfocitna leukemija.....	15
1.2.1.2 Morbus Hodgkin	18
1.2.1.3 Non-Hodgkin limfomi-NHL	19
1.2.2 Anemije.....	21
1.2.2.1 Anemije zbog poremećaja metabolizma gvožđa	23
1.2.2.1.1 Anemija zbog deficita gvožđa (Anaemia hyposideremica) ..	23
1.2.2.1.2 Sideroblastne anemije (Anaemia sideroblastica).....	24
1.2.2.1.3 Megaloblastne anemije (Anaemia megaloblastica).....	24
1.2.2.1.4 Perniciozna anemija (Anaemia perniciosa)	25
1.2.2.2 Hemolizne anemija (Anaemia haemolyticae)	25
1.2.2.3 Anemije u hroničnim bolestima	27
1.2.2.4 Aplastična anemija	28
1.2.3 Mijelodisplastični sindrom (MDS).....	28
1.2.4 Trombocitopenije.....	30

1.2.5	<i>Trombotična trombocitopenijska purpura (TTP)</i>	31
1.2.6	<i>Idiopatska trombocitopenična purpura (ITP)</i>	33
1.2.7	<i>Sistemski eritemski lupus (Lupus erythematosus systemicus)</i>	35
1.2.8	<i>Miastenia Gravis (Myasthenia Gravis)</i>	38
2.	ZNAČAJ ISTRAŽIVANJA	41
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	43
4.	HIPOTEZE	44
5.	METODOLOGIJA	45
5.1	ISPITANICI.....	45
5.1.1	<i>Odabir ispitanika</i>	45
5.2	PROTOKOL ISPITIVANJA.....	46
5.2.1	<i>Određivanje direktnog antiglobulinskog testa</i>	47
5.2.2	<i>Određivanje direktnog testa utroška antihumanog globulina</i>	47
5.2.3	<i>Interpretacija rezultata</i>	50
5.2.4	<i>Određivanje vrednosti eritrocita, trombocita, leukocita, hemoglobina i hematokrita</i>	50
5.3	METODE STATISTIČKE OBRADJE PODATAKA	51
6.	REZULTATI	52
7.	DISKUSIJA	85
8.	ZAKLJUČAK	101
9.	LITERATURA	102

SKRAĆENICE:

- **DAT** – direktni antiglobulin test
- **AHG** – antihumani globulin
- **DTU-AHG** – direktni test utroška antihumanog globulina
- **TTP** – trombotična trombocitopenijska purpura
- **ITP** – idiopatska trombocitopenična purpura
- **HLL** – hronična limfocitna leukemija
- **NHL** – non-Hodking limfomi
- **MG** – Miastenija gravis
- **LE** – Lupus erythematosus
- **HBN** – hemolizna bolest novorođenčeta
- **HTR** – hemolizna transfuzijska reakcija
- **AIHA** – autoimuna hemolizna anemija
- **MDS** – mijelodisplastični sindrom
- **Erc** - eritrociti
- **Trc** - trombociti
- **Leu** - leukociti
- **Hgb** – hemoglobin
- **Htc** – hematokrit
- **MCV** – srednja vrednost volumena eritrocita
- **MCH** – srednja vrednost količine hemoglobina u jednom eritocitu
- **MCHC** – srednja vrednost koncentracije hemoglobina u svim eritrocitima
- **vWF** – von Willebrand-ov faktor
- **MAHA** – mikroangiopatske hemolizne anemije

UVOD

1.1 Imuni sistem

1.1.1 Definicija

Imuni sistem je odbrambeni sistem organa i ćelija koji štiti telo od napada stranih mikroorganizama (virusa, bakterija, gljivica, parazita), njihovih hemijskih toksina, kao i sopstvenih izmenjenih ćelija.

Imunost predstavlja reakciju imunog sistema na strane supstance kao što su mikroorganizmi i makromolekuli (proteini i polisaharidi), bez obzira na fiziološke i patološke posledice takve reakcije.

1.1.2 Klasifikacija

- a) **Humoralna imunost:** predstavlja skup mehanizama odbrane organizma koji su posredovani molekulima koji se nalaze u telesnim tečnostima, sekretima i ekskretima.
- b) **Celularna imunost:** predstavlja one mehanizme odbrane koji su posredovani ćelijama koje svojim direktnim dejstvom učestvuju u eliminaciji opasnosti
- c) **Urođena (nespecifična) imunost:** predstavlja prvu liniju odbrane. Molekuli za prepoznavanje su kodirani genima koji su jednaki i funkcionalni u svim ćelijama našeg organizma. Čine je koža, mukozne membrane, normalna flora i sekreti, koji predstavljaju nepovoljnu sredinu za većinu patogena.
- d) **Stečena (specifična) imunost:** predstavlja drugu liniju odbrane, kada patogen prođe prirodnu odbranu. Tada dolazi do pokretanja specifičnog imunog odgovora i pamćenja tako da pri sledećem kontaktu sa istim antigenom ćelije imunog sistema brže i u većoj količini stvaraju odgovarajuća antitela. Molekuli za prepoznavanje kodirani su genima nastali rekombinacijom DNK segmenata, koja se dešava u svakom T ili B limfocitu

Imuni sistem svakog čoveka učestvuje u očuvanju homeostaze: sprečavanjem prodora stranih agenasa u organizam i eliminacijom agenasa koji su prodrli u organizam. Pored toga prepoznaje i eliminiše funkcionalno i morfološki izmenjene ćelije (1-3).

Medijatori imunog odgovora su:

- a) **Fagociti:** imaju sposobnost da vežu mikroorganizme i da ih uklone fagocitozom. U fagocite spadaju neutrofili i monociti i predstavljaju prvu liniju odbrane
- b) **Limfociti:** T limfociti (ćelijski imunitet) i B limfociti (humoralni imunitet). T limfociti pomažu B limfocitima u sintezi antitela a B limfociti kontrolišu dejstvo T limfocita. B limfociti na svojoj površini imaju imunoglobuline (najčešće IgM), receptor za complement i Fc fragment za antitela dok T limfociti nemaju.
- c) **Proteinski sistem komplementa:** grupa serumskih proteina sa funkcijom ćelijske lize. Ovi proteini su neaktivni kao proenzimi do momenta aktivacije kada se pretvaraju u aktivne enzime koji pojačavaju imunološki proces. Sistem komplementa čini više od 20 proteina koji su svrstani u komponente komplementa (od C1 do C9), komponente alternativnog puta (B, D, P), regulatorne proteine (C1sINH, C4bp, H, I, S), ćelijske receptore (C1qR, C3aR, C5aR, CR1, CR2, CR3, CR4) i membranske regulatorne proteine (CR1, DAF, MCP, HRF). Receptori na površini fagocitnih ćelija imaju visok afinitet za C3b komponentu komplementa i njegovo prisustvo na površini eritrocita je pokazatelj pojačane destrukcije in vivo.

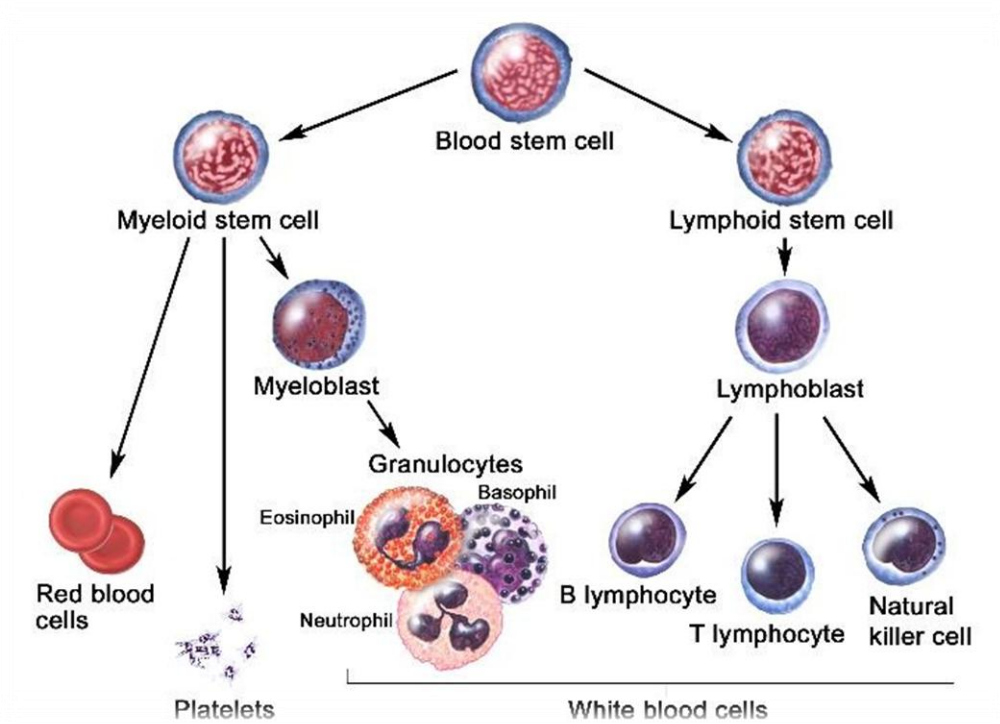
Do aktivacije komponenti sistema komplementa može doći klasičnim, alternativnim i lektinskim putem. Od tri načina aktivacije sistema komplementa, klasični put nastaje aktivacije nakon reakcije antigen-antitelo. Posle aktivacije klasičnim putem koja se smatra zavisnom od reakcije antigen-antitelo kao finalni produkt dolazi do formiranja tubularnog litičkog kompleksa (C5-C9) koji je lipofilan, ugrađuje se u dvostruki lipidni sloj membrane pa se otvara kanal između unutrašnjosti ćelije i spoljne sredine. Antitelo (antitela klase IgM i IgG mogu da aktiviraju komplement) vezano za antigen aktivira komplement klasičnim putem dok za alternativni put nije potrebno prisustvo antitela. Krajnji cilj je liza ćelije i pojačanje imunog odgovora (4-9).

1.1.3 Organi i tkiva imunog sistema

Na osnovu funkcija organi i tkiva se dele na primarne i sekundarne organe i tkiva limfnog sistema.

1.1.3.1 Podela limfnih organa

- a) **Centralne (primarne):** Predstavljaju mesta gde se limfoidne ćelije proizvode i diferenciraju. Timus je primarni limfoidni organ dok je kostna srž primarno limfoidno tkivo (Slika 1).
- b) **Periferne (sekundarne):** Predstavljaju ona mesta ka kojima limfoidne ćelije migriraju, dolaze u kontakt sa antigenima i postaju specifične limfoidne ćelije. Slezina i limfni čvorovi su sekundarni limfoidni organi, dok su sekundarna limfoidna tkiva ona koje se nalaze na sluznicama (10).



Izvor: Kenneth Todar PhD, 2013

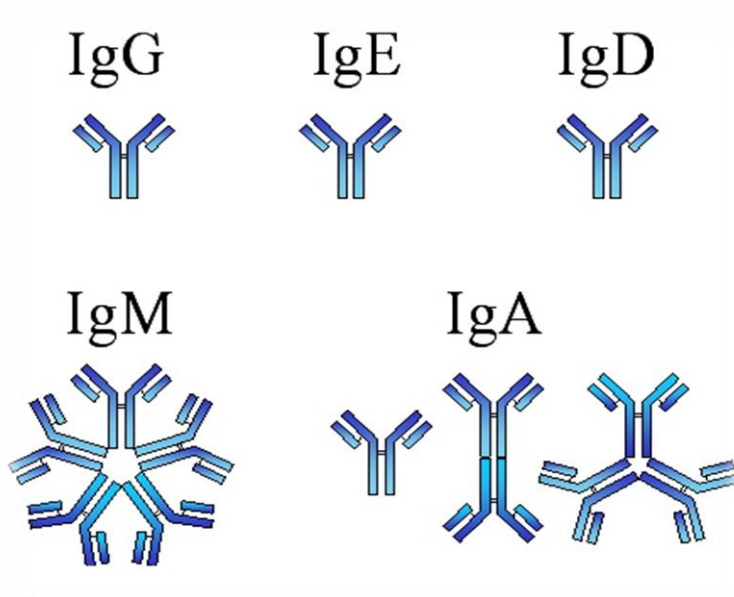
Slika 1. Diferencijacija imunog sistema

1.1.4 Poremećaji

Bilo koji poremećaj u radu imunog sistema ima za posledicu slabost funkcionalnosti tog sistema. U poremećaje imunog sistema spadaju autoimune bolesti, alergijske reakcije kao i stanja imunodeficijencije. Kod autoimunih bolesti je poremećena imunološka tolerancija prema sopstvenom tkivu pa odbrambeni sistem reaguje protiv sopstvenog organizma. Kod alergijskih reakcija dolazi do preteranog aktiviranja imunog sistema. Imunodeficijencije se odlikuju smanjenom aktivnosti odbrambenog sistema i mogu biti urođene i stečene

1.1.5 Antitela

Antitela su imunoglobulini koje stvaraju B limfociti i plazma ćelije. Građeni su od dva laka i dva teška lanca a kod ljudi moguća je pojava različitih izotipova antitela: IgG, IgM, IgA, IgE i IgD (Slika 2). Ona svoju funkciju ostvaruju tako što se pomoću Fab fragmenta prvo vežu za antigen a potom preko svog Fc fragmenta aktiviraju različite efektorne mehanizme, dovodeći do eliminacije prepoznatog antigena. U imunohematologiji antitela mogu da se klasifikuju na prirodna i imuna u zavisnosti od toga da li se nalaze kao prirodno prisutna u serumu osoba kod kojih nisu postojali imunizacijski događaji: koje nisu dobijale transfuziju, bile izložene fetomaternalnoj hemoragiji ili nisu transplantirane alogenim graftom. Funkcija antitela su neutralizacija i opsonizacija antigena i/ili aktivacija sistema komplementa.



Izvor: Beltina.org, 2014

Slika 2. Podela imunoglobulina i njihova građa

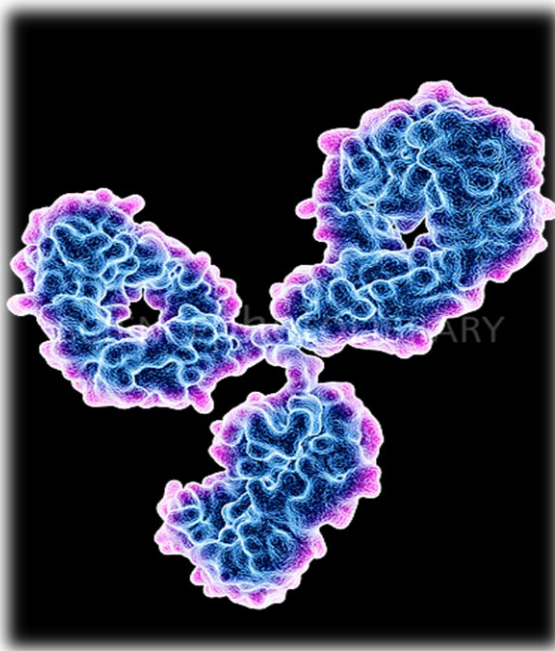
Sva antitela ostvaruju svoj biološki efekat vezujući se za komplemetarni antigen. Antitelo stvoreno nakon aloimunizacije stranim antigenima eritrocita je klinički značajno kada može da dovede do destrukcije eritrocita (11).

Klinički značaj antitela stvorenih nakon aloimunizacije stranim antigenima eritrocita zavisi od nekoliko faktora:

1. Specifičnosti antitela
2. Koncentracije antitela
3. Temperaturnog opsega delovanja antitela
4. Klase antitela
5. Aktivnosti fagocitnog sistema
6. Gustine antigena na membrani eritrocita.

Reakcija između antigena i antitela može da se odigra in vivo i in vitro. Parametri koji karakterišu tu reakciju su: specifičnost, afinitet i aviditet. Specifičnost je uslovljena specifičnošću antitela za odgovarajući antigen. Afinitet je mera jačine reakcije između antigena i antitela a aviditet obuhvata afinitet i sve druge reakcije koje

stabilizuju kompleks antigen-antitelo. Na jačinu vezivanja kompleksa utiču i karakteristike sredine u kojoj se reakcija odvija, kao što su pH, jonska jačina i temperatura sredine. Krajnji rezultat stvaranja kompleksa antigen-antitelo je hemoliza eritrocita koja može biti intra i ekstravaskularna. Do intravaskularne hemolize dolazi dejstvom antitela klase IgM dok se ekstravaskularna destrukcija eritrocita dešava u slezini i jetri pod dejstvom IgG antitela (Slika 3).



Izvor: Science Photo Library, 2014

Slika 3. Struktura IgG antitela

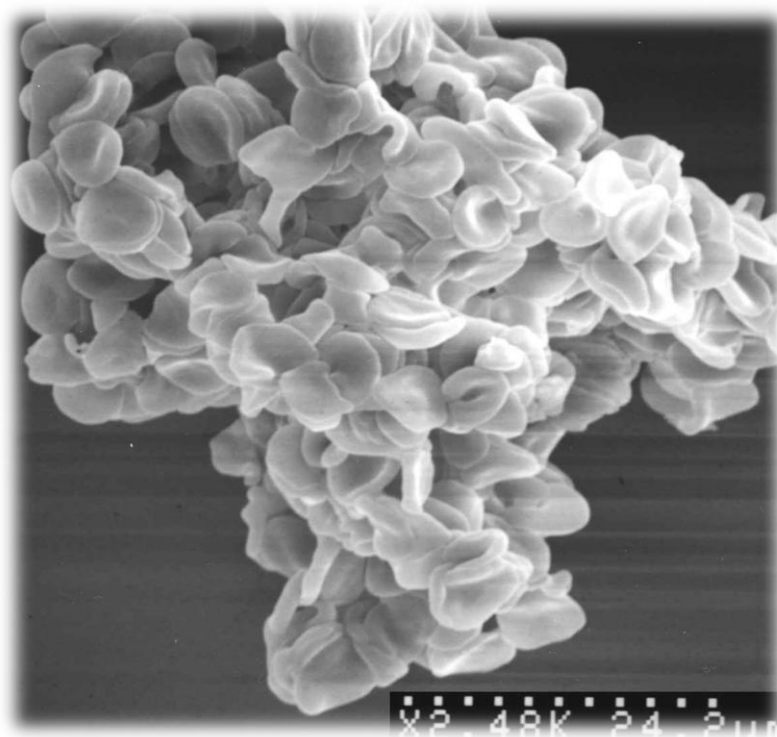
Antitela stvorena nakon aloimunizacije stranim antigenima trombocita reaguju sa brojnim membranskim strukturama na površini trombocita kao što su kompleksi glikoproteina IIb/IIIa, Ib/IX, GPIV i GPV i najčešće su klase IgG i IgM. Nastaju kao rezultat aloimunizacije prilikom transfuzije trombocita, trudnoće i transplantacije. Dovode do destrukcije trombocita i posledične trombocitopenije.

Antitela stvorena nakon aloimunizacije stranim antigenima leukocita su najčešće antigranulocitna antitela čijim delovanjem dolazi do neutropenije a samim tim i

leukopenije. Nastaju nakon transfuzija krvi i krvnih produkata i mogu biti auto i/ili aloantitela.

1.1.6 Aglutinacija eritrocita

Interreakcija između antigena i antitela in vitro otkriva se najčešće vidljivom aglutinacijom. Fenomen aglutinacije je prvi zapazio Creit 1869.godine kada je mešajući krv zeca sa krvlju različitih životinja uočio gomilice nepoznatog porekla . Dvadeset godina kasnije Charrin i Roger su otkrili da bakterije mogu praviti skupine sa serumom životinja koje su prethodno bile zaražene istim bakterijama. Međutim, kada je Kraus 1867. godine dobio zamućenje mešanjem bakterijskog filtrata sa serumom životinje, koja je prethodno imunizovana tim filtratom, napravljena je razlika između dva osnovna tipa reakcije između antigena i antitela. Prvi tip je reakcija aglutinacije u kojoj je reakcija između antigena koji se nalazi na čvrstoj površini (ćelija, bakterija) i odgovarajućeg antitela iz seruma, a drugi tip je imunoprecipitacija gde su oba reaktanta solubilna (12,13) (Slika 4).



Izvor: Annil Aggrawal's internet journal of forensic medicine, 2005

Slika 4. Reakcija aglutinacije posmatrana pod elektronskim mikroskopom

Reakciju aglutinacije u transfuziološku praksu je uveo Ottenberg 1908. godine mešanjem seruma pacijenta i eritrocita davaoca i tako primetio pojavu aglutinacije u slučaju inkompatibilnosti. Tek 1944. godine Race i Wiener su otkrili antitelo koje nije davalo direktnu aglutinaciju, iako je reagovalo sa odgovarajućim antigenom na eritrocitima. Ova antitela se nazivaju neaglutinišuća ili inkompletna antitela jer nisu dovela do aglutinacije. Detekcija ovih antitela postala je moguća 1945. godine posle otkrića antihumanog globulina (AHG) od strane Coombs-a. Za otkrivanje antitela na eritrocitima korišćen je serum zečeva imunizovanih humanim globulinima (antitelima).

Zečija antiglobulin antitela su reagovala svojim Fab fragmentima sa Fc fragmentima inkompletnih humanih antitela vezanim za antigene na eritrocitima. Stvoreni su mostovi između eritrocita sa pojavom vidljive aglutinacije. Bez obzira da li se reakcija između antigena i antitela odigrava u epruveti, na predmetnom staklu, u mikropločama, da li se radi manuelno ili automatizovanim sistemima, pozitivan rezultat uvek predstavlja pojava aglutinata. Reakcija aglutinacije odvija se u dve faze. Prvu fazu karakteriše kontakt specifičnih antitela sa antigenima na membrani i zove se senzitivizacija (opsonizacija), dok se druga faza zove aglutinacija i predstavlja formiranje većih ili manjih grupa ćelija (aglutinata).

Senzitivizacija zavisi od koncentracije antitela, pristupačnosti antigenih mesta, mobilnosti i koncentracije antigena na membrani. Takođe, na nju utiču temperatura, vreme inkubacije, pH i jonska jačina rastvora. Većina klinički značajnih antitela su klase IgG koja reaguju na temperaturi 37 °C. Antitela klase IgM optimalno reaguju na temperaturi 22 °C ili nižoj.

Posle senzitivizacije dolazi do međusobnog povezivanja i vizualizacije reakcije antigen-antitelo formiranjem rešetke. Na njen nastanak utiče rastojanje između eritrocita, koncentracija antigena i antitela i centrifugiranje. U fiziološkom rastvoru, eritrociti se nalaze na međusobnom rastojanju zbog zeta potencijala ili sile odbijanja između eritrocita. Zbog veličine i pentamerne strukture IgM molekula antitela, aglutinacija eritrocita obloženih antitelima IgM klase u fiziološkom rastvoru je olakšana. Međutim, molekule antitela klase IgG su dimeri i zbog malog raspona Fab fragmenata, nesposobne da premoste razdaljinu između ćelija udaljenih delovanjem zeta potencijala, pa dovode samo do senzitivizacije eritrocita bez vidljive reakcije

aglutinacije. Rezultat reakcije aglutinacije izražava se kvantitativno, stepenovanjem jačine aglutinacije antigena i antieritrocitnih antitela (14).

Konvencionalno očitavanje reakcije aglutinacije u epruveti podrazumeva stepenovanje od 0 do 4+ modifikovano po Marsh-u:

- **4+ (četiri plusa)**, kada se sa dna epruvete odvoji jedan kompletan aglutinat
- **3+ (tri plusa)**, kada se odvoje 2-3 aglutinata uz bistar supernatant
- **2+ (dva plusa)**, kada se odvoji više aglutinata srednje veličine i veliki broj sitnih aglutinata
- **1+ (jedan plus)**, kada postoji veliki broj sitnih aglutinata u supenziji neaglutinisanih eritrocita
- **+/- (plus minus)**, kada su aglutinati teško uočljivi makroskopski a njihovo prisustvo potvrđuje se mikroskopski
- **0 (nula)**, aglutinati nisu vidljivi ni mikroskopski.

1.1.7 Direktan antiglobulinski test i direktni test utroška antihumanog globulina

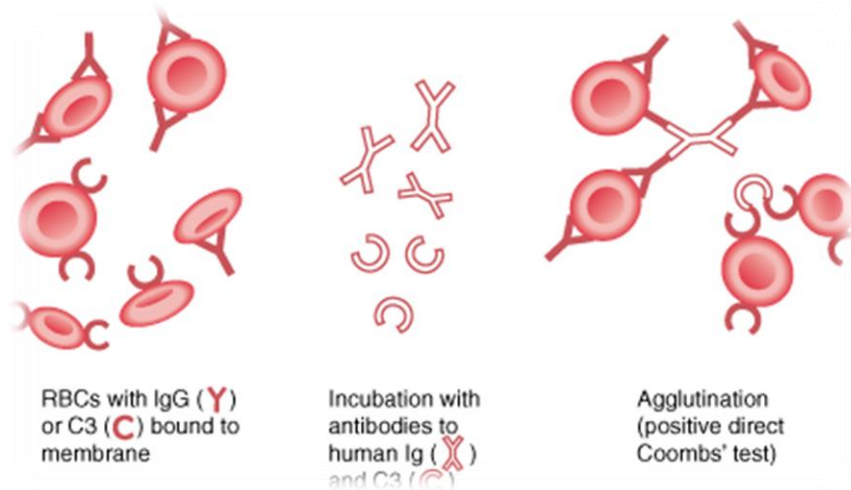
Godine 1946. Coombs, Mourant i Race uveli su direktni antiglobulinski test u rutinski rad u imunohematologiji i utvrdili njegovu namenu u dokazivanju neaglutinišućih količina antitela klase IgG i/ili komponenti komplementa vezanih za eritrocite in vivo (direktan Coombs-ov test ili antiglobulinski test-DAT) (16). Ustanovljeno je da reakcija između antigena eritrocita i odgovarajućeg antitela može da se dogodi bez vidljive reakcije aglutinacije. Da bi reakciju aglutinacije učinili vidljivom, proizveli su sekundarno antitelo koje je reagovalo sa eritrocitima obloženim antitelima, dajući vidljivu reakciju aglutinacije. Obzirom da su u pitanju bili humani globulini, sekundarno antitelo dobilo je naziv anti humani globulin (AHG) odnosno test je nazvan antiglobulinski test. Primena AHG reagensa u imunoserologiji omogućila je otkrivanje antieritrocitnih antitela klase IgG kod žena imunizovanih tokom trudnoće i bolesnika imunizovanih transfuzijom, dijagnostiku imunih hemoliznih anemija i identifikaciju antigena novootkrivenih krvnogrupnih sistema (15-18).

Princip antiglobulinskog testa je da se odvija u dve faze. U prvoj fazi testa dolazi do reakcije antigena i antitela, odnosno dolazi do vezivanja antitela za antigen na membrani eritrocita. U drugoj fazi, nakon dodavanja antihumanog globulin reagensa (AHG), antiglobulinska antitela iz reagensa vežu se za Fc fragment antitela na membrani eritrocita što omogućuje vidljivom reakciju aglutinacije. Kao sekundarno antitelo u antiglobulinskom testu koriste se polispecifični i monospecifični AHG reagensi.

Polispecifičan AHG reagens se koristi za "screening" IgG antitela i komponenti komplementa na eritrocitima i njegova pozitivnost ukazuje na prisustvo ili IgG i/ili komponenti komplementa na eritrocitima. Ako je test pozitivan, uzorak se mora dodatno testirati koristeći monospecifičan AHG reagens koji ima pojedinačnu specifičnost samo na antitela IgG ili IgM ili IgA, ili na C3b ili C3d komponente komplementa. Ovi reagensi dobijeni su tako što su životinjama ubrizgani humani globulini i proteinini sistema komplementa. Obzirom da se radi o stranim proteinima, kod životinja je pokrenut imuni odgovor koji je na kraju doveo do stvaranja antitela protiv humanog globulina i komponente komplementa C3. U polispecifičnom AHG reagensu nalaze se antitela: anti-IgG i anti C3d. Pozitivan nalaz u DAT-u zavisi od broja molekula na eritrocitima. Najmanji broj molekula antitela klase IgG po eritrocitu koji će dati pozitivan DAT kreće se od 100 do 150 a jako pozitivna reakcija nastaje pri broju 500 do 2000 molekula antitela po ćeliji, dok je broj molekula komplementa 400-1100 molekula C3d/eritrocitu.

Jačina reakcije takođe zavisi od toga da li se reakcija odigrala u rastvoru normalne ili niske jonske jačine. AHG reagens reaguje sa globulinima (antitelima) bez obzira da li su vezani za eritrocite ili su slobodni u reakcijskoj mešavini. Ukoliko posle ispiranja eritrocita u reakcionoj mešavini zaostanu slobodna antitela ili proteini komplementa, nakon dodavanja AHG reagensa doći će do njegove neutralizacije slobodnim antitelima/komplementom, pa će izostati vidljiva aglutinacija bez obzira na to što su eritrociti obloženi antitelima. Zbog toga je izuzetno važno da se eritrociti dobro isperu pre dodavanja AHG reagensa. Ispiranje se ponavlja nekoliko puta dok se u potpunosti ne uklone slobodna antitela. Direktni antiglobulinski test se može izvoditi metodom aglutinacije u epruveti ili mikrometodom u gelu. Smatra se da je

antiglobulinski test pozitivan kada nakon dodavanja AHG reagensa nastane vidljiva reakcija aglutinacije a negativan kada po završetku testa nema reakcije aglutinacije (19-21). Direktnim antiglobulinskim testom (DAT) otkrivaju se antitela klase IgG i/ili komplement C3 na eritrocitima ispitanika (Slika 5).



Izvor: The Merk Manual, 2013.

Slika 5. Direktni antiglobulinski test (direktni Coombs-ov test) i njegovo odvijanje po fazama

Godine 1956. direktni antiglobulinski test je modifikovan od strane Steffena i saradnika, u vidu direktnog antiglobulin konzumacionog testa odnosno direktnog testa utroška antihumanog globulina (AHG) (22). Ovim testom moguće je demonstrirati prisustvo ili odsustvo γ -globulina i na pacijentovim sopstvenim leukocitima ili trombocitima. Poznata količina antihumanog globulina dodaje se na oprane eritrocite, leukocite ili trombocite pacijenta. Posle odgovarajućeg vremena, antihumani globulin se uklanja sa ćelija i njegova potentnost se utvrđuje putem titracije RhD pozitivnih eritrocita senzibilisanih sa inkompletnim (IgG) anti-D antiserumom, paralelno sa jednakim zapreminama istog reagensa koji je bio u kontaktu sa eritrocitima, trombocitima ili leukocitima kontrolne zdrave osobe. Princip ovog testa zasniva se na činjenici da će IgG iz inkompletnog anti-D antiseruma vezanih za senzibilisane RhD pozitivne eritrocite, u kontaktu sa humanim antiglobulinom koji je prethodno bio u kontaktu sa opranim leukocitima i trombocitima pacijenta, pri čemu se "utrošio" (konzumirao) vezivanjem za antitela koja mogu biti prisutna na tim ćelijama, vezivati

utrošeni AHG, čija je posledica pozitivni DAT na RhD eritrocitima. Utrošak AHG u dodiru sa eritrocitima, limfocitima i trombocitima zdravih kontrolnih osoba je najčešće jednak nuli, a kod pacijenata koji imaju vezana antitela na eritrocitima, leukocitima i/ili trombocitima, utrošak AHG postoji. Očitavanje ovog testa vrši se određivanjem razlike u titru antihumanog globulina i očitavanjem postojeće reakcije aglutinacije pacijentovih i kontrolnih supernatanta dobijenih u prvoj fazi reakcije AHG sa eritrocitima, trombocitima i leukocitima. Test se smatra pozitivnim ukoliko se dobije razlika u titru AHG za bar dva razređenja sa pacijentovim ćelijama u odnosu na titar ćelija zdrave, kontrolne osobe (18).

Pozitivan antiglobulinski test i patološka konzumacija testa utroška humanog antiglobulina mogu postojati u sledećim kliničkim stanjima:

1. Hemolizna bolest novorođenčeta (HBN)
2. Hemolizna transfuzijska reakcija (HTR)
3. Autoimuna hemolizna anemija (AIHA)
4. Autoimuna hemolizna anemija izazvana lekovima
5. Antitela stvorena od strane davaoćevih B limfocita u transplantiranim organima ili tkivima
6. Velika inkompatibilnost u sistemu ABO između davaoca i primaoca kostne srži
7. Kod pacijenata lećenih intravenskim imunoglobulinom (IV IgG) i antilimfocitnim globulinom (ALG)
8. Stanja u kojima je povećana koncentracija imunoglobulina.

Pozitivan antiglobulinski test i patološka konzumacija testa utroška humanog antiglobulina mogu postojati u raznim bolestima:

1. Talasemija
2. Bubrežne bolesti
3. Multipli mijelom
4. Autoimune bolesti
5. AIDS
6. Leukopenije

7. Trombocitopenije

Za utvrđivanje uzroka pozitivnog DAT-a i patološke konzumacije AHG-a značajni su: anamneza, klinička slika, pol, uzrast, prisustvo ili odsustvo antitela u cirkulaciji pacijenta i jačina pozitivnosti testa. Interpretacija i evaluacija rezultata pozitivnog DAT-a i patološke konzumacije AHG-a mora biti posmatrana u sklopu osnovne bolesti pacijenta kao i istorije same bolesti.

Pozitivan DAT je značajan pokazatelj potencijalnog imunog razaranja eritrocita *in vivo*, ako je praćen kliničkim znacima hemolize eritrocita i laboratorijskim vrednostima (niske vrednosti eritrocita, hemoglobina, hematokrita, a povišene vrednosti retikulocita, bilirubina, LDH) (23).

Direktni test utroška AHG-a je direktni pokazatelj prisustva antitela vezanih za eritrocite, trombocite i leukocite pacijenta, koja mogu dovesti do pojave anemije, leukopenije i trombocitopenije. U toj činjenici se ogleda značaj njegove primene u kliničkoj medicini (24-26).

1.2 Imunohematološke bolesti

Citopenija je jedna od glavnih karakteristika u kliničkoj slici mnogih hematoloških bolesti i može nastati interakcijom sledećih mehanizama: smanjene produkcije i/ili pojačane destrukcije krvnih ćelija. Smanjena produkcija krvnih ćelija može biti posledica supresije koštane srži i smanjenja produkcije krvnih ćelija uzrokovane humoralnim mehanizmom ili zbog infiltracije koštane srži malignim ćelijama. Citopenija takođe može nastati zbog pojačane destrukcije krvnih ćelija, gde jedan od uzroka može biti autoimuni mehanizam. Primenom direktnog antiglobulinskog testa može se utvrditi prisustvo antitela vezanih za eritrocitnu membranu, dok se upotrebom testa utroška antihumanog globulina može utvrditi prisustvo antitela i na površini leukocita i trombocita.

1.2.1 Limfoproliferativna oboljenja

U grupu limfoproliferativnih oboljenja ubrajaju se: hronična limfocitna leukemija (HLL), Hodgkinov limfom (Hodgkinova bolest) i non-Hodgkin limfomi.

1.2.1.1 Hronična limfocitna leukemija

HLL je hronično limfoproliferativno oboljenje koje nastaje zbog monoklonske proliferacije i akumulacije limfocita u kostnoj srži, perifernoj krvi, slezini, limfnim žlezdama, jetri i drugim organima. HLL je zastupljena u 25% bolesnika sa dijagnozom leukemije. Najčešće se javlja u osoba preko 50 godina starosti a izuzetno retko u osoba ispod 30 godina života. Imunološka ispitivanja su pokazala da se u preko 95% bolesnika radi o B HLL a svega u 2 do 5 % o leukemiji T limfocita (56). Veliku ulogu u etiologiji nastanka HLL imaju hromozomske anomalije, najčešće trizomija hromozoma 12, mada često mogu zahvatati i hromozome 14q+, 13q+, 11q+ (27).

Kod većine pacijenata bolest počinje neprimetno, postepenim otokom limfnih žlezda koje su bezbolne. Simptomi i znaci HLL nastaju zbog tkivne infiltracije limfocitima, citopenije u perifernoj krvi i imune supresije. Pacijenti mogu imati znake hemolizne anemije, trombocitopenije ili mogu imati učestale infekcije. Prilikom pregleda kod pacijenta se mogu naći uvećane limfne žlezde koje nisu bolne prilikom palpacije. Spleno- i hepatomegalija mogu biti prisutne u kasnijim stadijumima bolesti, a kod pacijenata kod kojih se razvila trombocitopenija, i hemoragijski sindrom (27-35). U laboratorijskim nalazima prisutna je hiperleukocitoza koja je uslovljena limfocitozom. Apsolutni broj limfocita je $5 \times 10^9/l$, može da bude do $300 \times 10^9/l$ ili više. Imunofenotipizacijom limfocita najčešće se radi o B ćelijama koje su pozitivne na CD19+, CD20+ a monoklonske su zbog ekspresije samo jednog lakog lanca imunoglobulina lambda ili kapa (36).

Internacionalna grupa za HLL je postavila kriterijume za dijagnozu bolesti:

1. Broj limfocita u perifernoj krvi treba konstantno da bude iznad $10 \times 10^9/l$, a većina ćelija ima osobine zrelih limfocita
2. Više od 30% ćelija sa jedrom u aspiratu kostne srži su limfociti

3. Većina limfocita periferne krvi je pozitivna na B ćelijske imunofenotipske markere

U slučajevima gde je broj limfocita u perifernoj krvi mali, potrebno je imunofenotipizacijom dokazati njihovu monoklonalnost.

Bolest se klasifikuje po Rai-u u 5 stadijuma a po Binet-u u 3 stadijuma.

Rai klasifikacija:

- **0 stadijum** - limfocitoza u perifernoj krvi i kostnoj srži - niska rizična grupa
- **I stadijum** - limfocitoza sa uvećanjem limfnih žlezda - srednja rizična grupa
- **II stadijum** - limfocitoza sa uvećanjem jetre i/ili slezine - srednja rizična grupa
- **III stadijum** - limfocitoza sa anemijom, vrednosti hemoglobina ispod 100g/l - visoka rizična grupa
- **IV stadijum** - limfocitoza sa trombocitopenijom, vrednosti trombocita ispod $100 \times 10^9/l$ - visoka rizična grupa

Binet klasifikacija:

- **A stadijum** - manje od 3 područja uvećanja limfnih žlezda, bez anemije i trombocitopenije
- **B stadijum** - 3 ili više područja uvećanja limfnih žlezda, bez anemije i trombocitopenije
- **C stadijum** - anemije (hemoglobin < 100g/l) ili trombocitopenija (trombociti < $100 \times 10^9/l$) bez obzira na broj područja sa uvećanjem limfoidnog tkiva.

Ovi stadijumi su u korelaciji sa prognozom bolesti, pri čemu što je niži stadijum, prognoza je bolja. Komplikacije bolesti su infekcije, hemoragijski sindrom

zbog trombocitopenije i hemolizna anemija, što predstavlja najčešće uzroke smrtnog ishoda (37-39).

Značajan i koristan prognostički parametar je molekularna citogenetska analiza (FISH). Pokazano je da su del(17p13.1) kao i del(11q22.3) udružene sa kraćim ukupnim preživljavanjem kao i kraćim periodom do progresije bolesti.

Parametri prognoze nezavisni od kliničkih stadijuma HLL:

1. Hromozomske aberacije:
 - a. 13 (13q-)
 - b. 11 (11q-)
 - c. 17 (17p-)
2. Citoplazmatska detekcija ZAP70 u HLL-ćelijama
3. Ekspresija CD38 na HLL-ćelijama
4. Vreme udvostručavanja broja limfocita
5. Koncentracija β -2 mikroglobulina u serumu
6. Nivo solubilnog CD23-antigena u serumu
7. Aktivnost timidin-kinaze u serumu
8. Somatska hipermutacija u regionu V gena za Ig

U terapiji HLL se primenjuju:

1. **Kortikosteroidi** kod bolesnika sa znacima insuficijencije kostne srži kao i u slučajevima autoimune hemolizne anemije i trombocitopenije.
2. **Citostatski lekovi** - hlorambucil ili leukeran. Ciklofosfamid se najčešće daje u kombinaciji sa onkovinom i prednisonom u COP protokolu.
3. **Radioterapija**
4. **Transplantacija kostne srži** je indikovana u lečenju mladih osoba koje imaju HLL.

1.2.1.2 Morbus Hodgkin

Morbus Hodgkin se karakteriše bezbolnim uvećanjem limfoidnog tkiva, koje može da se javi u bilo kom delu tela. Postoje dva pika kada se najčešće javlja: jedan je u doba adolescencije i rane mladosti a drugi u dobu od 45 do 75 godina života (40-42).

Glavna patohistološka karakteristika je prisustvo Reed-Sternbergovih ćelija. Prema klasifikaciji Lukesa i Butlera, Hodgkinova bolest je podeljena na 4 histopatološka tipa:

- **Tip I** - limfocitna predominacija
- **Tip II** - nodulska skleroza
- **Tip III** - mešovita celularnost
- **Tip IV** - limfocitni deficit

Početak bolesti je postepen, najčešće sa pojavom uvećanja jedne grupe površinskih limfnih žlezda. Zahvaćene limfne žlezde su bezbolne. Da bi se odredio stadijum bolesti potrebno je da se uradi radiografija grudnog koša, magnetna rezonanca abdomena, limfografija, biopsija kostne srži (43,44).

Prema Ann Arbor klasifikaciji postoje 4 klinička stadijuma bolesti (45):

- **I** - zahvaćenost jedne limfne žlezde (I) ili jednog ekstralimfatičnog mesta (IE)
- **II** - zahvaćenost dva ili više područja limfnih žlezda sa iste strane dijafragme (II), ili lokalizovana zahvaćenost jednog ekstralimfatičnog područja i jednog ili više područja limfnih žlezda sa iste strane dijafragme (IIE)
- **III** - zahvaćenost limfnih žlezda sa obe strane dijafragme (III) koje može biti praćeno lokalizovanim ekstralimfatičnim područjem (IIIE) ili zahvaćenom slezinom (IIIS) ili obe (IIIES)
- **IV** - diseminovana bolest jednog ili više ekstralimfatičnih organa ili tkiva sa ili bez zahvaćenih limfnih žlezda

Svaki stadijum se deli na A i B u zavisnosti od toga da li postoje sistemske tegobe:

- **A** - bez simptoma
- **B** - temperatura ($>38^{\circ}\text{C}$), i/ili noćno znojenje, ili gubitak na težini $>10\%$ u prethodnih 6 meseci.

Dijagnoza bolesti se postavlja biopsijom limfnih žlezda ili tkiva i patohistološkim pregledom. Lečenje se sprovodi primenom radioterapije i hemioterapije.

1.2.1.3 *Non-Hodgkin limfomi-NHL*

U NHL postoji maligna monoklonska proliferacija limfoidnih ćelija od kojih većina pripada B ćelijama (85%) a manji deo T ćelijama (15%). To je grupa oboljenja koja ima različit klinički tok i ishod. Oni ne zahvataju samo limfne žlezde, već i ekstranodalna mesta kao što je gastrointestinalni trakt. Javljaju se u svim životnim dobima (46).

Danas se u svakodnevnoj praksi koristi klasifikacija Svetske zdravstvene organizacije iz 2008. godine

1. Zrele B-ćelijske neoplazme

- Hronična limfocitna leukemije/limfom malih limfocita
- Limfoplazmicitni limfom/Waldenstorm makroglobulinemija
- Mantle ćelijski limfom
- Difuzni B-krupnoćelijski limfom (DBKL)
 - DBKL bogat T-limfocitima/histiocitima
 - DBKL udružen sa hroničnom inflamacijom
 - Epstein-Barr virus (EBV) + DBKL starih
 - Primarni kutani DBKL, leg type
 - Intravaskularni DBKL
 - Limfomatoidna granulomatoza
 - Plazmoblastni limfom
 - Krupnoćelijski B-limfom nastao u multicentričnoj Castlemanovoj bolesti
 - Primarni efuzioni limfom

- Burkitt-ov limfom
- Splenični limfom marginalne zone
- Folikularni limfom
- Ekstranodalni limfom marginalne zone limfnog tkiva pridruženog mukozni
- Nodalni limfom marginalne zone
- Leukemija vlasastih ćelija

2. Zrele T- i NK-ćelijske neoplazme

- Mycosis fungoides
- Sezary sindrom
- Periferni T-ćelijski limfom
- Angioimunoblastni T-ćelijski limfom
- Supkutani panikulitisu sličan T-ćelijski limfom
- Agresivna NK-ćelijska leukemija
- Hepatosplenični T-ćelijski limfom
- Hidroa vakciniformni-slični limfom
- T-ćelijska prolimfocitna leukemija
- T-ćelijska leukemija velikih granuliranih limfocita
- Hronični limfoproliferativni poremećaj NK ćelija
- T-ćelijski limfom udružen sa enteropatijom

Najčešći nalaz su uvećani limfni čvorovi koji su čvrste konzistencije i bezbolni. Bolesnici se mogu žaliti na umor, gubitak u težini, povećanu temperaturu i znojenje, mada mogu biti i bez tegoba. U slučaju da je bolest lokalizovana u ekstralimfatičnom tkivu javljaju se simptomi u zavisnosti koji organ je u pitanju (47). Dijagnoza se uspostavlja biopsijom uvećanih limfnih žlezda i patohistološkim pregledom.

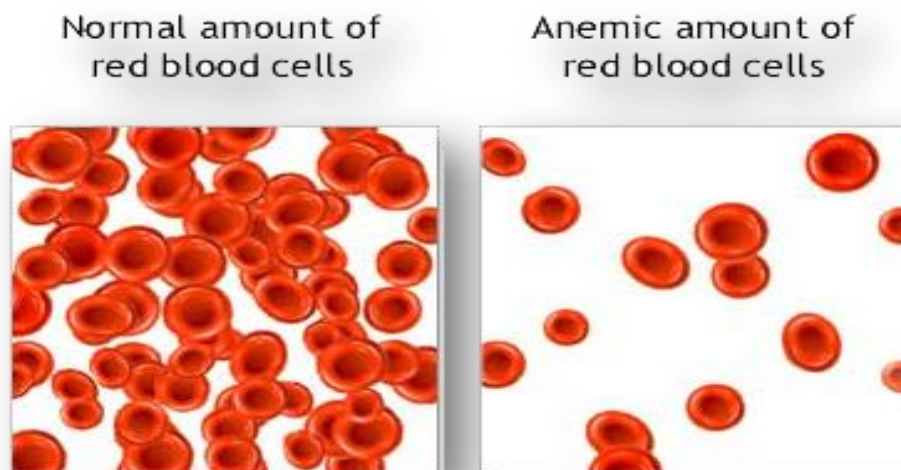
U terapiji NHL se primenjuje radioterapija i hemioterapija, najčešće u vidu CHOP protokola (ciklofosamid, adriablastin, onkovin i prednison).

Indukcijska terapija limfoproliferativnih bolesti se, po pravilu, sastoji od šest mesečnih citostatskih kura koje se mogu kombinovati sa radioterapijom. Standardni ishodi indukcijske terapije su remisija (kompletna i parcijalna), stabilna i progresivna bolest.

Limfoproliferativne bolesti karakteriše poremećaj imuniteta koji se manifestuje čestom pojavom infekcija, autoimunim pojavama i sekundarnim malignitetima. Najčešća autoimuna pojava u limfoproliferativnim bolestima je pojava antieritrocitnih antitela koja se mogu otkriti direktnim antihumanim globulinskim testom kao i direktnim testom utroška antihumanog globulina (48).

1.2.2 Anemije

Anemija je stanje definisano smanjenom količinom hemoglobina u krvi a klinički simptomima koji su posledica tkivne hipoksije i kompenzatornih mehanizama (Slika 6). Uzroci anemije mogu biti višestruki: gubitak krvi, smanjena proizvodnja ili ubrzana razgradnja eritrocita, poremećaji u građi eritrocita i hemoglobina, teškoće u vezivanju, transportu kiseonika. Anemija može biti urođena ili stečena (49-57). Anemija uzrokuje smanjeni transport i dotok krvi tkivnim ćelijama. To utiče na aktivaciju kompenzatornih mehanizama. Ako je u pitanju akutni gubitak krvi dolazi do aktivacije simpatikusa koji povećava tonus arterija i vena i preusmerava tok krvi ka srcu. U hroničnoj anemiji nastaje vazodilatacija krvnih sudova, povećanje srčanog udarnog volumena i ubrzanje frekvencije srca, povećanje plućne ventilacije, smanjuje se viskoznost krvi da bi se poboljšala prokrvljenost organa (58).



Izvor: PKD Diet, 2014

Slika 6. Razlika u broju eritrocita u anemičnim stanjima

Dominantan klinički znak je bledilo kože i sluzokože. Osnovni laboratorijski parametar za uspostavljanje dijagnoze anemije je koncentracija hemoglobina (Hgb). Prema kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije, anemija postoji ako je koncentracija hemoglobina ispod 130g/l kod muškaraca, 120g/l kod žena i 110g/l kod trudnica, dok su kod osoba starijih od 65 godina granice za 10g/l hemoglobina niže (59).

Težina kliničke slike anemije zavisi od brzine njenog nastanka, koncentracije hemoglobina i stanja kardiovaskularnog sistema i drugih organa. Bolesnici lakše podnose anemije hroničnog toka jer ima dovoljno vremena za razvoj kardiovaskularnih i biohemijskih mehanizama adaptacije. Starije osobe lošije podnose anemiju zbog slabije adaptibilnosti kardiovaskularnog sistema. Koncentracija hemoglobina je dobar parametar za procenu težine anemije (60-68).

Prema stepenu deficita hemoglobina anemije se dele u četiri stepena:

- **I** – blaga anemija (Hgb od 95-109g/l)
- **II** – srednje teška anemija (Hgb od 80 do 94g/l)
- **III** – teška anemija (Hgb od 65 do 79g/l)
- **IV** – anemija opasna po život (Hgb manji od 65g/l)

Anemija četvrtog stepena je apsolutna a anemija trećeg stepena relativna indikacija za transfuziju eritrocita.

Dijagnoza se postavlja anamnezom, kliničkim pregledom i na bazi osnovnih laboratorijskih pretraga (krvna slika, srednja vrednost zapremine eritrocita (MCV), srednja vrednost količine hemoglobina u jednom eritrocitu (MCH), srednja vrednost koncentracije hemoglobina u svim eritrocitima (MCHC), broj retikulocita), utvrđivanjem količine gvožđa (feremija, feritinemija) i specifičnim dopunskim analizama (69).

Lečenje anemije je etiološko i primarno se odnosi na lečenje bolesti koja je dovela do anemije, kao i transfuzijom eritrocitnih produkata.

1.2.2.1 Anemije zbog poremećaja metabolizma gvožđa

1.2.2.1.1 Anemija zbog deficita gvožđa (Anaemia hyposideremica)

Hiposideremijska anemija nastaje zbog deficita gvožđa u organizmu koji može da nastane usled povećanog gubljenja gvožđa iz organizma, loše apsorpcije u crevima, povećanih potreba organizma za gvožđem i zbog nedovoljnog unošenja gvožđa (70). Za postavljanje dijagnoze neophodni su:

1. Anamnestički podaci
2. Fizikalni nalaz
3. Laboratorijska ispitivanja: U perifernoj krvnoj slici postoji anemija sa hipohromijom eritrocita i mikrocitozom. Broj retikulocita je blago povećan ili normalan. MCV je smanjen. Broj leukocita i trombocita je normalan. U kostnoj srži postoji hiperplazija eritrocitne loze eritroblastnog tipa. Koncentracija serumskog gvožđa je smanjena, a TIBC i UIBC su povećani.
4. Ispitivanje gastrointestinalnog trakta.
5. Ispitivanje urogenitalnog trakta.

Terapija:

1. Preparati gvoždja – peroralni (150- 200 mg dnevno) ili parenteralni.
2. Transfuzije koncentrovanih eritrocita u teškim oblicima anemije.
3. Lečenje etiološkog uzroka anemije.

1.2.2.1.2 Sideroblastne anemije (Anaemia sideroblastica)

Sideroblastne anemije čini heterogena grupa poremećaja čija je glavna karakteristika nakupljanje gvožđa u perinuklearnim mitohondrijama eritroblasta u kostnoj srži, smanjenje sinteze hemoglobina i nagomilavanje gvožđa u tkivima. Glavna karakteristika je nagomilavanje gvožđa u obliku prstena oko jedra eritroblasta po kome su ti eritroblasti dobili naziv “ring” sideroblasti. Međutim, i pored povećane količine gvožđa, postoji hipohromija eritrocita jer se gvožđe ne koristi dovoljno za sintezu hema (71-73).

Sideroblastne anemije su nasledne i stečene (primarne ili idiopatske i pripadaju mijelodisplaznim sindromima i sekundarne ili izazvane lekovima, alkoholom, prisutne u drugim bolestima).

1.2.2.1.3 Megaloblastne anemije (Anaemia megaloblastica)

Megaloblastne anemije nastaju zbog poremećaja sinteze DNK za koju je potreban vitamin B12 i folna kiselina. Naziv su dobile prema megaloblastima, abnormalnim eritroblastima koji su tipični za ovaj oblik anemije. Megaloblastne ćelije podležu ubrzanoj razgradnji u kostnoj srži, što dovodi do neefektivne eritrocitopoeze. Pored eritrocitne loze, promenjene su i ostale krvne loze (74).

Etiološka klasifikacija megaloblastnih anemija (mehanizam odgovoran za nastanak anemije):

1. Deficit vitamina B12
2. Deficit folne kiseline
3. Ostali uzroci

1.2.2.1.4 Perniciozna anemija (*Anaemia perniciosa*)

Perniciozna anemija nastaje zbog deficita vitamina B12, odnosno poremećene apsorpcije vitamina B12, što je posledica nedostatka unutrašnjeg faktora (IF). U perifenoj krvnoj slici postoji anemija sa megalocitima, izraženom anizocitozom i poikilocitozom. MCV je povišen (preko 100 fl). Broj retikulocita je snižen ili normalan. Broj leukocita je umereno snižen sa prisustvom hipersegmentiranih granulocita dok je broj trombocita umereno snižen. Kostna srž je hipercelularna, sa hiperplazijom eritrocitne loze megaloplastnog tipa. U granulocitnoj lozi prisutni su džinovski metamijelociti i hipersegmentirani granulociti. Prisutni su hiperploidni megakariociti. Sideroblasti u kostnoj srži povećani su i do 100%. U serumu je snižena koncentracija vitamina B12. Gvožđe u serumu je povišeno sa povećanim stepenom zasićenja transferina 70-100%. Zbog neefektivne eritrocitopoeze povećan je indirektni bilirubin, LDH u serumu, kao i urobilinogen u urinu. U serumu većine bolesnika mogu se dokazati antiparijetalna antitela.

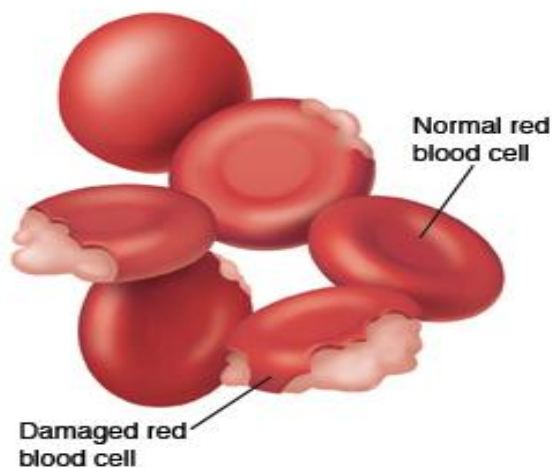
Gastroskopski pregled otkriva atrofični gastritis, što se potvrđuje i histopatološkim pregledom sluzokože želuca uzete biopsijom. Želudačna sekrecija je smanjena, slobodna hlorovodonična kiselina u želudačnom soku nedostaje i posle stimulacije histaminom. Poremećena resorpcija vitamina B12 dokazuje se Schillingovim testom, pomoću obeleženog vitamina B12, radioaktivnim kobaltom. Bolesnici sa pernicioznom anemijom izlučuju mokraćom manje od 8% oralno unete doze obeleženog vitamina (75).

Lečenje se sprovodi parenteralnom primenom vitamina B12.

1.2.2.2 Hemolizne anemija (*Anaemia haemolyticae*)

Hemolizne anemije su stanja gde je smanjenja koncentracija kiseonika u krvi nastala kao posledica raspadanja eritrocita i njihovog kraćeg životnog veka (Slika 7). Hemoliza eritrocita, čiji normalan vek iznosi 120 dana, je jedna od glavnih karakteristika autoimune hemolizne anemije (AIHA). AIHA se može klasifikovati kao primarna i sekundarna a može i prema tipu autoantitela koje je u pitanju (76). Autoantitelo može biti imunoglobulin G (IgG), M (IgM), ili retko imunoglobulin A

(IgA). Autoantitela mogu biti topla ili hladna autoantitela. Autoimuna hemolizna anemija često može biti povezana sa paroksizmalnom noćnom hemoglobinurijom (prouzrokuju je IgG antitela) i bolešću hladnih aglutinina (prouzrokuju je IgM antitela).



Izvor: University of Minnesota, 2012

Slika 7. Hemoliza eritrocita

Hemoliza eritrocita nastaje kao posledica fiksacije komponenti komplekta na zid eritrocita i može da rezultira ekstravaskularnom ili intravaskularnom hemolizom.

Ekstravaskularna hemoliza nastaje kada je aktivacija i fiksacija komponenti komplekta na membranu eritrocita nedovoljna da izazove aktiviranje membrane eritrocita. Komponente komplekta C3 i C4b prisutne na površini eritrocita, reaguju sa receptorima fagocita u plućima, jetri i slezini, te eritrociti bivaju fagocitirani. Slezina je primarno mesto hemolize.

Intravaskularna hemoliza nastaje kada je fiksacija komponenti komplekta na membrani eritrocita u dovoljnoj koncentraciji da se formira Membrane Attack Complex, i aktiviraju komponente komplekta C5-C9, što dovodi do liziranja eritrocita, hemoglobinemije, hemoglobinurije i hemosiderinurije. Klinički znaci su anemija, hemoliza, aglutinacija eritrocita, kao i prisustvo osnovne bolesti (77-79).

Kod zdravih osoba vek eritrocita iznosi od 90 do 120 dana i raspadanje eritrocita i njihovo uklanjanje iz cirkulacije se poklapa sa produkcijom novih eritrocita u kostnoj

srži. U slučaju kada je smanjen životni vek eritrocita, organizam jedinke inicijalno kompenzuje produkcijom većeg broja eritrocita, ali pošto ne uspeva istom brzinom kojom se ragrađuju eritrociti, nastaje anemija. Bilirubin je razgradni produkt hemoglobina, može da se akumulira i izazove žuticu i da se ekskretuje putem urina koji dobija tamno braon boju. U razmazu periferne krvi prisutni su sferociti, kao i retikulociti u povišenom broju. Nivo nekonjugovanog bilirubina je povišen kao i laktat dehidrogenaza, a u urinu je prisutan urobilinogen (51,80-98).

Podela hemoliznih anemija:

a. Korpuskularne hemolizne anemije:

1. **Membranopatske**
2. **Enzimopatske**
3. **Hemoglobinopatije:** talasemijski sindromi, kvalitativne hemoglobinopatije

b. Ekstrakorpuskularne hemolizne anemije:

1. **Imune:** izoimune i autoimune (autoimune hemolizne anemije sa toplim antitelima, bolest hladnih aglutinina, paroksizmalna hemoglobinurija na hladnoću)
2. **Neimune:** mehaničke hemolizne anemije, izazvane hemijskim i biološkim činiocima)

1.2.2.3 Anemije u hroničnim bolestima

Anemija u hroničnim bolestima prati različite bakterijske, dugotrajne infekcije i različite zapaljenske procese. Obično je blaga sa koncentracijom hemoglobina između 70 i 110 g/l i sama po sebi ne traži izlečenje. Osnovu patogeneze čine blokada gvožđa u crevnoj sluznici i makrofazima, smanjeno izlučivanje eritropoetina iz bubrega te rezistencija koštane srži na eritropoetin (99).

Najčešće se javlja u sklopu sledećih oboljenja:

- Hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji

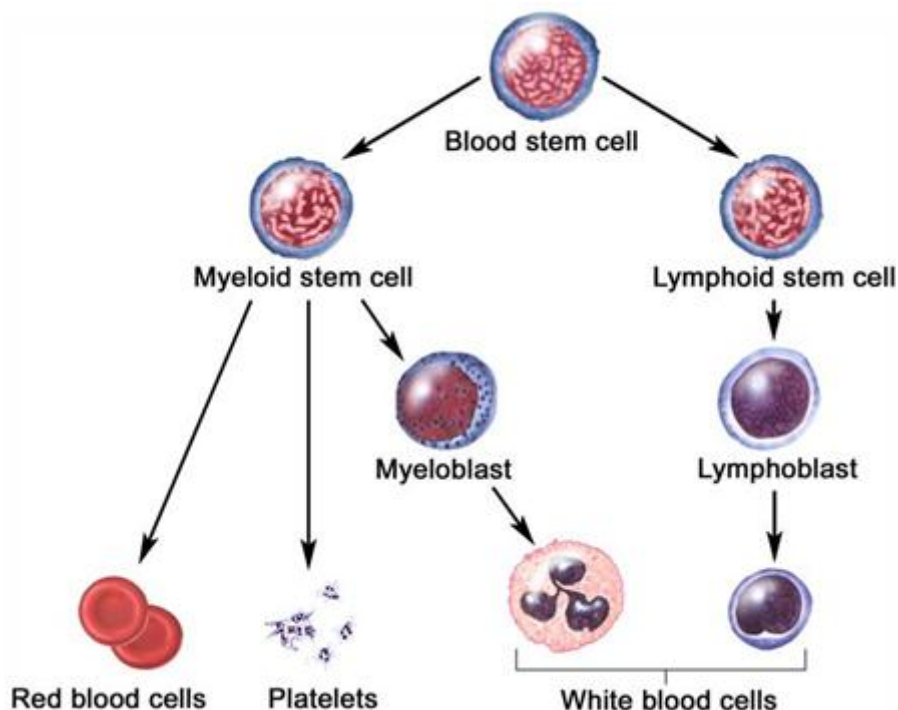
- Hipopituitarizmu
- Hipotireozi
- Adisonovoj bolesti
- Hipogonadizmu
- Dijabetesu
- Bolestima jetre

1.2.2.4 Aplastična anemija

U perifernoj krvnoj slici postoji pancitopenija (normocitna anemija, retikulociti su izrazito sniženi ili ih nema, granulocitopenija, trombocitopenija) (100). Prilikom punkcije kostne srži nalazi se aplastična kostna srž. Prilikom terapije primenjuju se androgeni: oksimetolon. Teška aplastična anemija leči se imunosupresivnom terapijom: primenom konjskog ili zečijeg antilimfocitnog globulina, antitimocitnog globulina ili primenom ciklosporina (101-111). Kod bolesnika sa teškom aplastičnom anemijom, pogotovo kod mlađih bolesnika ako imaju HLA podudarnog srodnog davaoca, terapija izbora je transplantacija matičnih ćelija hematopoeze (112-116).

1.2.3 Mijelodisplastični sindrom (MDS)

MDS su klonske bolesti koje zahvataju prethodnike (progenitore) svih loza hematopoeze (Slika 8). Karakterišu se refrakternom anemijom, leukopenijom i trombocitopenijom uz nalaz diseritropoeze, abnormalne granulocitopoeze i atipičnih megakariocita u hiperplastičnoj kostnoj srži (67, 117-121).



Izvor: Terese Winslow, 2007

Slika 8. Šematski prikaz poremećaja razvoja svih krvnih loza kod pacijenata sa MDS-om.

U perifernoj krvnoj slici postoji anemija, granulocitopenija i trombocitopenija. Aktivnost enzima laktat dehidrogenaze i koncentracija mokraćne kiseline u serumu često su povišene. Razmaz periferne krvi pokazuje morfološke promene jedne ili svih krvnih loza. Tipičan nalaz je hipercelularna kostna srž, retko se nalazi hipocelularna kostna srž, sa prisutnim morfološkim promenama, odnosno kvalitativnim promenama krvnih loza: diseritropoeza (eritroidna hiperplazija), “ring” sideroblasti, displastični eritroblasti, megaloblastoza, vakuolizacija citoplazme (122-129).

Protokol lečenja MDS nije standardizovan zbog nejasne patogeneze, relativno hroničnog toga, starijeg životnog doba i čestog prisustva pridruženih bolesti kod većine bolesnika, heterogenosti same bolesti i izrazito varijabilne prognoze.

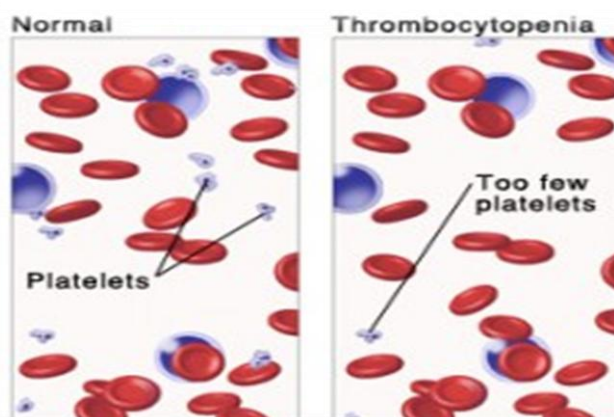
Susptituciona terapija derivatima krvi je najčešće primenjivana simptomatska terapija. Transfuzije eritrocita se primenjuju kod znakova anemije i nivoom hemoglobina manjim od 80-90g/l. Kod bolesnika kod kojih se planira transplantacija

matičnih ćelija hematopoeze primenjuju se ozračeni eritrociti. Moguće komplikacije dugotrajne primene transfuzija eritrocita su alosenzibilizacija na eritrocitne antigene i sekundarna hemosideroza. Opterećenje organizma gvožđem doprinosi morbiditetu i utiče na dužinu preživljavanja.

1.2.4 Trombocitopenije

Trombocitopenije mogu biti uzrokovane smanjenem stvaranja trombocita ili ubrzanom razgradnjom trombocita (Slika 9). Kod trombocitopenija koje su uzrokovane smanjenim stvaranjem trombocita, neophodno je otkriti i lečiti uzrok trombocitopenije. Trombocitopenije se javljaju u sklopu bolesti hematopoeznih organa, slezine, infektivnih oboljenja (130-132). Trombocitopenije koje su uzrokovane ubrzanom razgradnjom trombocita se odlikuju kratkim zadržavanjem trombocita u krvotoku i kompenzatorno ubrzanom trombocitopoezom. Takvi bolesnici imaju povećanu koncentraciju RNA u trombocitima i hemostatički su aktivniji.

Trombocitne transfuzije nisu delotvorne jer se i transfundovani trombociti ubrzano razgrađuju istim patofiziološkim mehanizmom kojim se razgrađuju i bolesnikovi trombociti. Transfuzijsko lečenje treba primeniti kada je ugrožen život bolesnika i tada su potrebne česte transfuzije većeg broja koncentrata trombocita. Posledica takvog lečenja je česta aloimunizacija pacijenata kao i refrakternost bolesnika na transfuzije trombocita (133).



Izvor: University of Minnesota, 2012

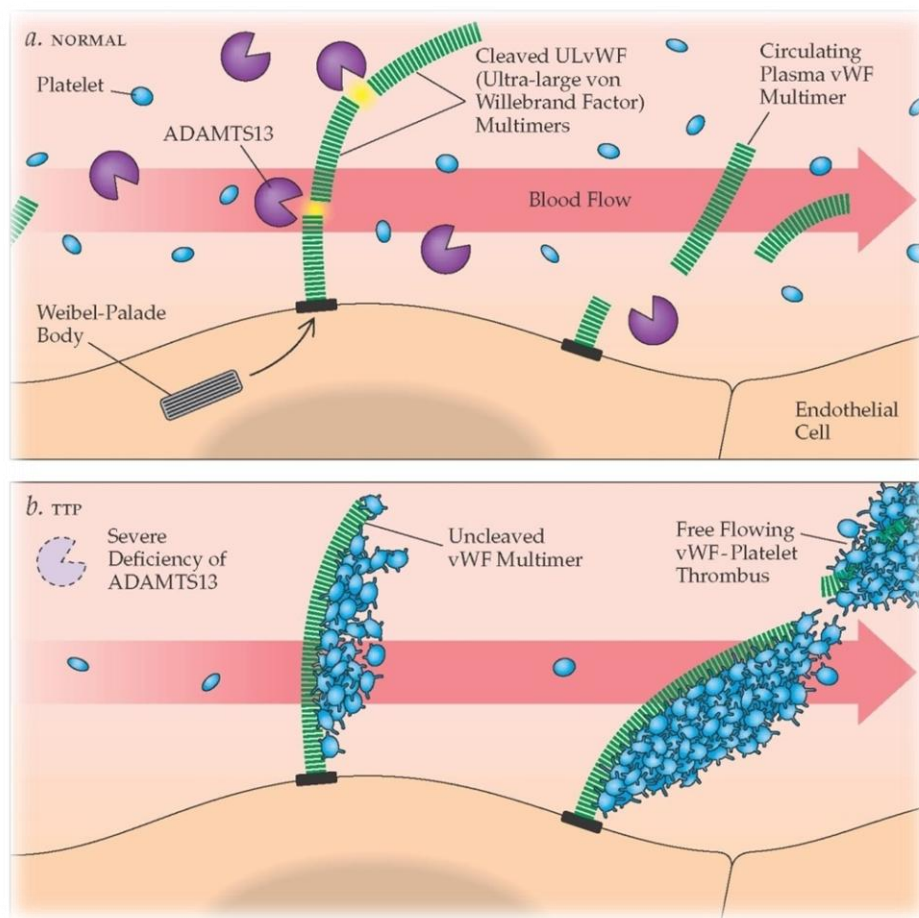
Slika 9. Normalne vrednosti trombocita i trombocitopenija

1.2.5 Trombotična trombocitopenijska purpura (TTP)

TTP je tromboznohemoragijski poremećaj u kojem postoji patološko difuzno stvaranje mikrotromba bogatih trombocitima u malim krvnim sudovima. Klinički se ispoljava pentadom simptoma: trombocitopenija, mikroangiopatska hemolizna anemija (MAHA), povišena temperatura, neurološki poremećaji i oštećenje bubrega. Nastaje kao posledica kvantitativnog ili kvalitativnog poremećaja funkcije metaloproteinaze – ADAMTS 13. Posledično dolazi do nakupljanja multimeričkog vWF (Von Willebrand faktor), javljaju se neobično velike molekulske mase na ćelijama endotela, taloženje mikrotromba i posledično oštećenje organa (Slika 10). Učestalost oboljenja se procenjuje na 4-11 slučajeva na milion stanovnika (134-137).

Podela TTP:

- **Nasledni TTP** - Upshaw-Schulman sindrom – progresija do hronične bubrežne insuficijencije
- **Stečeni TTP** - uzrokovan lekovima, infekcijama, primarnim malignitetom, autoimunom bolešću, transplantacijom matičnih ćelija hematopoeze).



Izvor: Medivisuals, 2010

Slika 10. Poremećaj u krvnim sudovima kod TTP-a

Klinička slika:

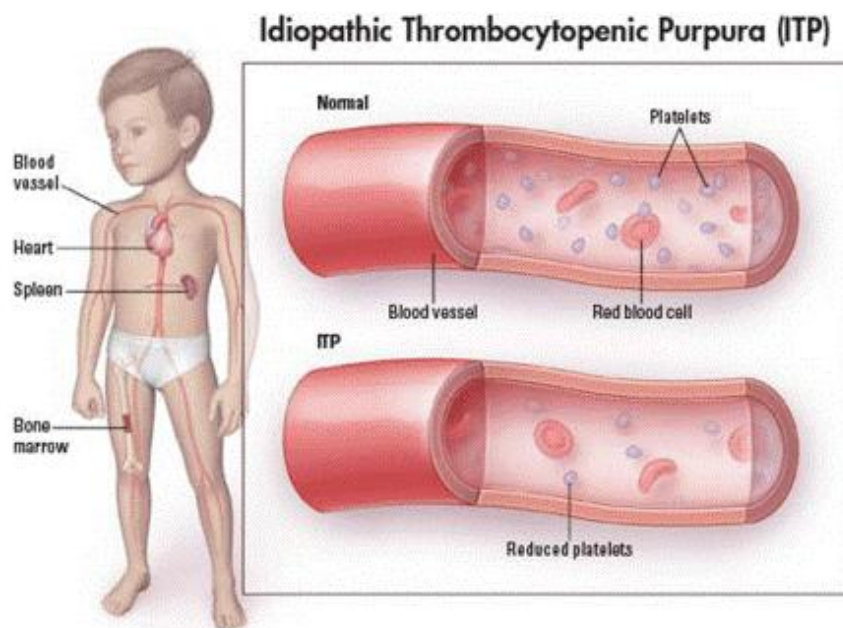
- MAHA
- Trombocitopenija
- Neurološki poremećaji
- Povišena temperatura
- Oštećenje bubrega
- Hemoglobin snižen (obično oko 80 g/l), trombociti sniženi $20-50 \times 10^9/l$, u razmazu periferne krvi prisutni eritrocitni fragmenti
- Coombs-ov test negativan

- Hemostaza: protrombinsko vreme i aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme su normalnih vrednosti, fibrinogen normalne vrednosti ili lako povišen, D dimeri lako povišeni
- Urea i kreatinin – povišeni
- Bilirubin blago povišen (indirektni)
- LDH često višestruko povišen
- Haptoglobin snižen.

U okviru terapije primenjuju se terapijske izmene plazme, zamrznuta sveža plazma, kriosupernatant (plazma osiromašena krioprecipitatom), kortikosteroidi, transfuzije trombocita, rituximab, splenektomija (138,139).

1.2.6 Idiopatska trombocitopenična purpura (ITP)

ITP je autoimuno oboljenje u kojem velika količina antitela opsonizira trombocite i dovodi do njihove pojačane razgradnje u slezini. Pokretači imunog mehanizma u akutnom obliku bolesti najčešće su virusi ili drugi infektivni agensi, kao i neki lekovi (Slika 11). Akutni ITP se javlja kod dece nekoliko nedelja nakon kliničke slike infekcije dok se hronični ITP javlja kod odraslih i nije poznato šta uzrokuje stvaranje antitela (49).



Izvor: Childrenhospital.org, 2014

Slika 11. Autoimuni poremećaj kod ITP-a

Akutna ITP se skoro uvek javlja kod dece, i to u uzrastu do deset godina. Bolest obično počinje posle virusne infekcije gornjih respiratornih puteva. Pojava simptoma je nagla, tokom nekoliko sati, u vidu izraženih krvarenja po koži (petehije, ekhimoze) i sluzokoži usne duplje, nosa, digestivnog i urogenitalnog sistema. Prognoza bolesti je dobra, krvarenja obično prestaju za nekoliko dana (najduže nekoliko nedelja) i česte su spontane remisije (142).

Hronična ITP se češće javlja kod mlađih žena (obično do 40. godine). Bolest počinje postepeno, povremenim spontanim krvarenjima u koži i sluzokožama. Krvarenja nisu izrazito obilna, a ispoljavaju se u vidu petehija, ekhimoza, menometroragija, epistaksi. Pojavi bolesti može nekoliko godina da prethodi sklonost ka modricama ili obilna i produžena menstrualna krvarenja, pri čemu je broj trombocita normalan (143). Tok hronične ITP odlikuju periodi kliničkih remisija i recidiva krvarenja, koji se godinama smenjuju. Veoma su retka spontana izlečenja, za razliku od akutne ITP.

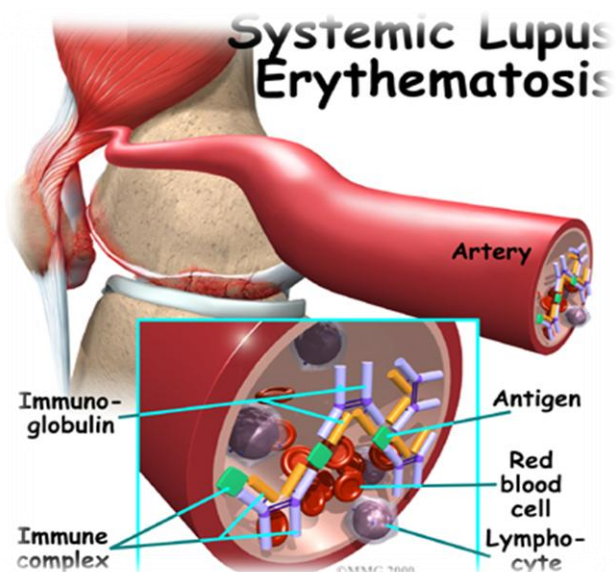
Dijagnoza se postavlja na osnovu kliničkog nalaza i laboratorijskih rezultata. U krvnoj slici je smanjen broj trombocita i često prisutna sideropenijska anemija. Vreme krvarenja je produženo, na trombocitima se nalazi povećan broj antitela uz skraćen životni vek trombocita (144).

Osnovu terapije čine kortikosteroidi i splenektomija. Kod bolesnika koji ne reaguju na splenektomiju treba primeniti imunosupresiju. Kod izrazitih krvarenja primenjuje se suportivna terapija trombocitima (145).

1.2.7 Sistemski eritemski lupus (Lupus erythematosus systemicus)

Sistemski eritemski lupus predstavlja autoimunu bolest čije su glavne odlike zahvaćenost više organskih sistema, prisustvo mnogobrojnih autoantitela od kojih neka učestvuju u imunološkom oštećenju tkiva (Slika 12). Iako ova bolest može zahvatiti mnoge organe, najčešće su promenama zahvaćeni koža, bubrezi, zglobovi, hematopoezno tkivo, centralni nervni sistem. Istraživanja pokazuju da prosečno jedna od 2000 osoba oboli od lupusa. Sistemski eritemski lupus je primarno bolest mladih žena, a starosna dob u kojoj najčešće obolevaju je između 15 i 40. godine života

Dosadašnja istraživanja nisu mogla u potpunosti da otkriju koji je uzrok nastanka ove bolesti. Smatra se da je za nastanak lupusa odgovorno zajedničko dejstvo više faktora: egzogenih i endogenih. Među spoljašne faktore spada dejstvo infektivnih agenasa, dok kod unutrašnjih faktora najzapaženiju ulogu igraju genetska predispozicija i hormonski status. Takođe, dejstvo ultravioletnih zraka podstiče i pogoršava kožne manifestacije bolesti (146).



Izvor: Eorthopod.com, 2014

Slika 12. Autoimuni poremećaj kod sistemskog eritematoznog lupusa

Sistemski eritemski lupus je bolest čija klinička slika izuzetno varira. Početak bolesti je praćen nespecifičnim simptomima, povišenom temperaturom i malaksalošću, bolovima u zglobovima i mišićima, promenama na koži, anemijom i smanjenjem broja belih krvnih zrnaca. Obično bolest zahvata samo jedan organ da bi se kasnije javile i druge kliničke manifestacije. Klinički tok olakšava prisustvo specifičnih antitela još na početku bolesti, tako da je moguće na vreme započeti lečenje. Zglobno - mišićni simptomi se javljaju kod većine bolesnika i obično se ispoljavaju bolom u zglobu (artralgija) ili u obliku prolaznog artritisa velikih zglobova. Kožne promene se sreću kod 80% bolesnika i manifestuju se u vidu eritema obraza (u obliku leptira) i kao eritemska ili makulopapulozna ospa koja zahvata šire površine kože izložene suncu.

Razni oblici kožnog vaskulitisa javljaju se u oko 20% pacijenata. Ranice na sluzokoži usta i nosa su tipične za akutni tok bolesti. Suvi ili eksudativni pleuritis su najčešća plućna manifestacija bolesti. Ovo oboljenje zahvata i srce dovodeći u najvećem broju slučajeva do perikarditisa. Kod oko polovine bolesnika prisutne su i bubrežne promene koje mogu dovesti i do hronične bubrežne insuficijencije. Autoimuni proces kod lupusa može oštetiti i nervne strukture, tako da kod pojedinih pacijenata može doći do napada epilepsije ili psihoza. Hematološki poremećaji su, takođe, vrlo učestali i

karakterišu se prisustvom anemija i smanjenjem broja leukocita. Oštećenje endotela u okviru vaskulitisa indukuje nastanak tromboza malih krvnih sudova

Pouzdan način u postavljanju dijagnoze bolesti predstavlja prisustvo specifičnih antitela u krvi bolesnika. Prema najnovijem kriterijumu za dijagnostikovanje bolesti, neophodno je da su prisutna najmanje četiri vrlo jasna simptoma iz već opisane kliničke slike.

Savremene metode lečenja uključuju:

- nefarmakološko lečenje
- farmakološke mere
- druge standardne tretmane.

Standardni terapijski protokoli za pojedine entitete sistemskog lupusa uključuju glikokortikoide kao prvi terapijski pristup, zatim rano uvođenje ciklofosfamida kao i uvođenje standardnih citotoksičnih lekova. Primarni cilj u lečenju jeste postizanje remisije i bolje kontrole bolesti kao i sprečavanje pogoršanja uz izbegavanje neželjenog dejstva lekova (101,147).

Drugi lekovi i postupci u lečenju sistemskog lupusa u vidu manje toksične, specifičnije imunosupresije:

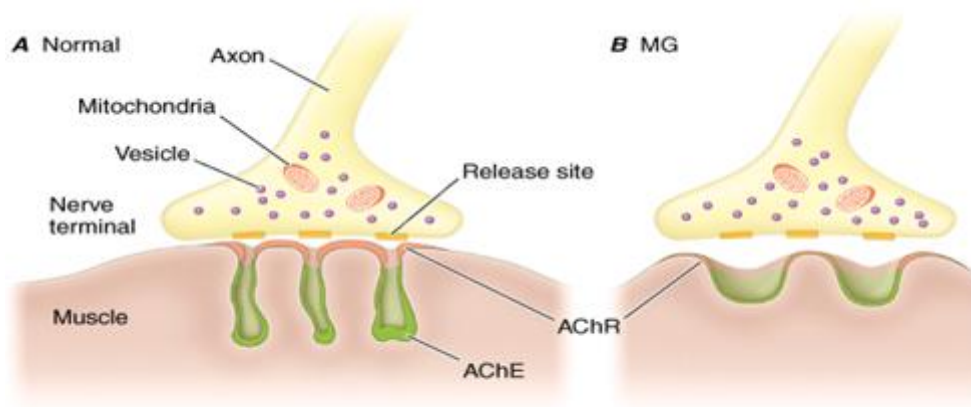
- Mikofenolat mofetil
- Fludarabin
- Kladribin
- Leflunomid, Ciklosporin, Takrolimus
- Monoklonska antitela
- Bindarit
- Imunoablacija sa autologom transplantacijom matične ćelije hematopoeze

1.2.8 *Miastenia Gravis (Myasthenia Gravis)*

Miastenia gravis je bolest autoimune prirode koja nastaje delovanjem antitela na proteine neuromuskularnih sinapsi (acetilholinski receptori). Posledica tog delovanja je oslabljen učinak acetil-holina potrebnog za izazivanje mišićne kontrakcije. Nema promena na nervima i mišićima, ali postoji poremećaj u prenosu nadražaja sa nerva na mišić, što uzrokuje pojavu mišićne slabosti (Slika 13).

Miastenija je stečena bolest. Bolest se retko javlja, a simptomi bolesti veoma često ostanu neprepoznati (60). U Evropi su epidemiološke studije pokazale da se broj obolelih kreće od 7 do 15 bolesnika na 100 000 stanovnika. Miastenija se javlja u oba pola, češće kod žena, i to u dobi od 20. do 40. godine života. Kod muškaraca se češće javlja posle 50. godine života (148-157).

Neuromuskularna sinapsa je spoj između nerva i mišića. Svako nervno vlakno na svom kraju ima proširenje u kojem se nalaze mehurići u kojima je neurotransmiter (acetilholin). Kada je nervno vlakno nadraženo, acetilholin se oslobađa iz mehurića i kroz kanaliće ulazi u prostor između nerva i mišića i dolazi do površine mišićnog vlakna, na kojoj se nalaze receptori za acetilholin. Spaja se sa receptorima i kada se svi receptori popune, mišićno vlakno se kontrahuje. Nakon toga acetilholin napušta receptore, acetilholinesteraza ga razgrađuje i on se ponovo vraća u nervno vlakno, a kontrakcija mišića popušta. Kod zdrave osobe taj se proces stalno ponavlja dok se izvršava određeni pokret. Kod osobe obolele od miastenije dolazi do stvaranja antitela koja su odgovorna za pojavu bolesti jer sprečavaju vezivanje acetilholina za receptore. Tokom bolesti, broj receptora se smanjuje (kod nekih oblika miastenije ima čak do 50% manje receptora). Zbog toga prvi nadražaji koji putuju nervnim vlaknom oslobađaju acetilholin koji popuni sve postojeće receptore pa se acetilholin koji se i dalje oslobađa nema za šta da veže, zbog čega se mišićna vlakna ne mogu kontrahovati i snaga mišića slabi (158). Kod 10% bolesnika s miastenijom udružena je i pojava tumora timusa (timom), a kod 70% bolesnika uvećan je timus (hiperplazija timusa) (159).



Izvor: Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition 2013

Slika 13. Autoimuni poremećaj kod miastenije gravis

U najčešće simptome spadaju:

- padanje očnih kapaka
- slabost mišića lica
- padanje donje vilice ili nemogućnost njenog zatvaranja
- dizartrija (otežan govor)
- disfagija (otežano gutanje)
- problemi sa disanjem u vidu nemogućnosti udaha ili isprekidanog disanja
- nemogućnost ponavljanja određenih radnji

Miastenija gravis može se pogoršati uzimanjem određenih lekova (npr. sedativa, antiepileptika, antihistaminika, beta blokatora), kod traume, povišene telesne temperature.

Dijagnoza se uspostavlja na osnovu anamneze, kliničkog pregleda i specijalnih testova koji se izvode. Simptomi se povlače primenom endrofonijum-hlorida koji se koristi u dijagnostičkim testovima. Endrofonijum-hlorid se primenjuje intravenski. Njegovo delovanje je kratkotrajno pa se ne koristi u lečenju već samo kao dijagnostički test. Za dijagnostičke ali i za terapijske potrebe koristi se prostigmin koji ima duže vreme delovanja. Oba leka su inhibitori holin-esteraze čijom inhibicijom se povećava količina neurotransmitera (acetil-holina) na postsinaptičkoj membrani i time jača mišićna kontrakcija. Elektromiografija nije specifično promenjena kod miastenije gravis

ali može poslužiti u diferenciranju u odnosu na druge bolesti sa sličnim simptomima (65). Analiza antitela pokazuje pozitivna antitela na acetilholinske receptore (anti-AChR) ili pozitivna antitela na mišićnu specifičnu kinazu (anti-MuSK). Većina bolesnika ima pozitivna anti-AChR antitela (75%). Postoji manji broj bolesnika koji imaju simptome miastenije, ali imaju negativna i jedna i druga antitela (seronegativni bolesnici) (160).

Cilj lečenja je ublažavanje ili nestanak simptoma. U lečenju se koriste lekovi koji blokiraju razgradnju acetil holina blokirajući enzim koji ga razgrađuje (inhibitori acetilholinaze), ali se koriste i lekovi i postupci kojima se stabilizuju imunološke reakcije (kortikosteroidi, imunoglobulini, plazmafereza), a u težim slučajevima i operacija timusa (161).

2. ZNAČAJ ISTRAŽIVANJA

Citopenija je jedna od glavnih karakteristika u kliničkoj slici hematoloških bolesti i može nastati interakcijom sledećih mehanizama: smanjene produkcije i/ili pojačane destrukcije krvnih ćelija. Smanjena produkcija krvnih ćelija često je posledica supresije koštane srži i smanjenja produkcije krvnih ćelija uzrokovane humoralnim mehanizmom ili zbog infiltracije koštane srži malignim ćelijama. Citopenija takođe može nastati zbog pojačane destrukcije krvnih ćelija gde jedan od uzroka može biti autoimuni mehanizam. Primenom direktnog antiglobulinskog testa može se utvrditi prisustvo antitela vezanih za eritrocitnu membranu, dok se upotrebom testa utroška antihumanog globulina može utvrditi prisustvo antitela i na površini leukocita i trombocita.

Studija sprovedena u Bergenu, na klinici za neurologiju pratila je rezultate testa utroška AHG-a kod pacijenata sa dijagnozom miastenije gravis. Rezultati su pokazali patološku konzumaciju kod preko 60% pacijenata (162). Studija Van Longhema i saradnika obuhvatila je pacijente sa dijagnozom sistemskog lupusa gde je utvrđena korelacija između patološke konzumacije AHG-a i lošije kliničke slike pacijenata (26,163). Mnogobrojna ispitivanja su vršena gde se određivao stepen konzumacije AHG nakon kontakta sa trombocitima i leukocitima kod pacijenata sa raznim hematološkim oboljenjima i utvrđivana njegova značajnost u dijagnozi i prognozi bolesti.

Uprkos postojanju rezultata dosadašnjih studija koje su ukazale na značaj primene testa utroška AHG-a, u našim uslovima, u rutinskom radu u transfuziološkoj praksi, još nema pravih podataka o sprovedenim testiranjima pacijenata upotrebom ove tehnike. Pored toga, primena direktnog testa utroška AHG predstavlja novinu u odnosu na primenu postojećeg testa, koji se koristi za detekciju antitela na površini eritrocita (DAT), jer je višestruko senzitivniji obzirom da se titracija senzibilisanih eritrocita radi sa razređenjima AHG (najmanje do devetostrukog razređenja u titru od 1/1024).

Ono što čini poseban doprinos istraživanju je činjenica da primena ovog testa nije ograničena samo na testiranje eritrocita već se može primeniti i na trombocite i leukocite i ukazati na vezane globuline na trombocitima i leukocitima. Samim tim je i efikasniji od postojećeg testa jer jednokratnim testiranjem uzorka pacijenta, stičemo

uvid tokom ispitivanja u imunološka zbivanja kod sve tri krvne loze. Istraživanje koje bi obuhvatalo ispitivanje utroška AHG-a kod osoba obolelih od navedenih hematoloških i autoimunih bolesti doprinelo bi potpunijem uvidu u imunološko stanje pacijenta, omogućilo praćenje dinamike vezivanja antitela na svim krvnim ćelijama, omogućilo praćenje uspešnosti primenjene terapije i predikciju toka i ishoda bolesti.

Uvođenje ovog testa u rutinsku transfuziološku upotrebu ima i svoju ekonomsku opravdanost jer ne zahteva veća ulaganja po pitanju aparature i opreme a u poređenju sa tehnikom aglutinacije mikrometodom u gelu je daleko jeftiniji jer nije potrebna nabavka mikropruveta (kartica). Veoma je jednostavan za primenu a dovoljno efikasan i senzibilan da bi se mogao primeniti kao deo rutinskog testiranja uzoraka pacijenata u transfuziološkoj praksi.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Poređenje rezultata testiranja direktnog testa utroška antihumanog globulina i direktnog antiglobulinskog testa kod pacijenata pre i posle primljene terapije i na osnovu dobijenih rezultata utvrđivanje da li je osetljiviji test utroška antihumanog globulina ili direktni antiglobulin test.
- Utvrđivanje povezanosti između citopenije i stepena konzumacije antihumanog globulina.
- Utvrđivanje da li razlika u titru AHG veća od dva razređenja sa pacijentovim ćelijama u odnosu na zdrave u direktnom testu utroška antihumanog globulina ima pozitivnu prediktivnu vrednost u odnosu na tok bolesti.

4. HIPOTEZE

- Direktni test utroška antihumanog globulina je značajno osjetljiviji test u odnosu na direktni antihumani globulin test.
- Postoji pozitivna korelacija između citopenije i stepena konzumacije antihumanog globulina.
- Razlika u titru AHG veća od dva razređenja sa pacijentovim ćelijama u odnosu na zdrave u direktnom testu utroška antihumanog globulina ima pozitivnu prediktivnu vrednost na tok bolesti.

5. METODOLOGIJA

5.1 Ispitanici

Studija je bila prospektivnog karaktera. Ispitivanjem je bilo obuhvaćeno ukupno 100 pacijenata oba pola, sa dijagnostikovanom anemijom, limfoproliferativnim oboljenjem (Morbus Hodgkin, non-Hodgkin limfomi i hronična limfocitna leukemija), mijelodisplastičnim sindromom (MDS), trombocitopenijom, trombotičnom trombocitopenijskom purpurom (TTP), idiopatskom trombocitopeničnom purpurom (ITP), sistemskim lupusom i miastenijom gravis kao i pacijenti koji su upućeni da im se izvrši testiranje standardnog direktnog antiglobulinskog testa. Dijagnoza bolesti ispitivanih pacijenata utvrđivana je na Klinici za hematologiju, nefrologiju, neurologiju Kliničkog centra u Novom Sadu kao i u Hematološkoj dnevnoj bolnici Poliklinike Kliničkog centra u Novom Sadu. Testiranje direktnog antiglobulinskog testa kao i direktnog testa utroška antihumanog globulina sprovedeno je u Laboratoriji za tipizaciju tkiva Zavoda za transfuziju krvi Vojvodine. Svi pacijenti su bili upoznati sa ciljem i protokolom ispitivanja. Kontrolnu grupu je činilo 20 zdravih osoba (nasumično odabrani dobrovoljni davaoci krvi), kod kojih nije dijagnostikovano hematološko ili autoimuno oboljenje. Pacijenti i dobrovoljni davaoci krvi su dobrovoljno učestvovali u ovoj studiji, što su potvrdili pismenim pristankom za učestvovanje u istraživanju.

5.1.1 Odabir ispitanika

Ispitanici su bili uključeni u ispitivanje na osnovu sledećih kriterijuma:

- Pacijenti oba pola sa dijagnostikovanom anemijom, limfoproliferativnim oboljenjem (Morbus Hodgkin, non-Hodgkin limfom i hronična limfocitna leukemija), MDS-om, trombocitopenijom, TTP-om, ITP-om, sistemskim lupusom i miastenijom gravis.
- Pacijenti koji su upućeni da im se izvrši testiranje standardnog direktnog antiglobulinskog testa.

U ispitivanje nisu uključene osobe:

- Osobe kojima nije uspostavljena dijagnoza anemije, limfoproliferativnog oboljenja, MDS-a, trombocitopenije, TTP-a, ITP-a, sistemskog lupusa i miastenije gravis.
- Novorođenčad

5.2 Protokol ispitivanja

Protokol ispitivanja je podrazumevao inicijalna merenja na početku studije. Svim pacijentima sa dijagnozom anemije, limfoproliferativnog oboljenja (Morbus Hodgkin, non-Hodgkin limfom i hronična limfocitna leukemija), MDS-a, trombocitopenije, TTP-a, ITP-a miastenije gravis, sistemskim lupusom se iz uzoraka periferne krvi u količini od 3ml uzetih u epruvete sa EDTA antikoagulansom (Slika 14) vršile sledeće analize krvi: određivane su vrednosti eritrocita, trombocita, leukocita, hemoglobina, hematokrita, direktni antihumani globulinski test i direktni test utroška antihumanog globulina. Nakon primene odgovarajuće terapije svim pacijentima je ponovljen identičan protokol kao na početku ispitivanja.



Izvor: Reddit.com, 2014

Slika 14. Uzorci krvi u epruvetama sa EDTA antikoagulansom

5.2.1 Određivanje direktnog antiglobulinskog testa

Direktni antiglobulinski test je vršen mikrometodom aglutinacije u gelu na karticama (LISS)/Coombs ID sa inkorporiranim AHG-om u svakoj jažici (Slika 15).



Izvor: Med4you.at, 2014

Slika 15. Liss/Coombs gel kartice sa inkorporiranim AHG-om

Test je izvođen tako što se napravila suspenzija od 10 μ l eritrocita pacijenta i 1ml rastvora niskog jonskog napona (LISS, ID diluent). Po 50 μ l suspenzije eritrocita se ukapalo u jednu jažicu na gel kartici. Gel kartice su se centrifugirale 10 minuta na 3500 rpm i vizuelno se očitavao nalaz. Dobijeni rezultat aglutinacije mikrometodom u gelu se očitavao kao negativan ili pozitivan sa skorom 1+, 2+, 3+ ili 4+.

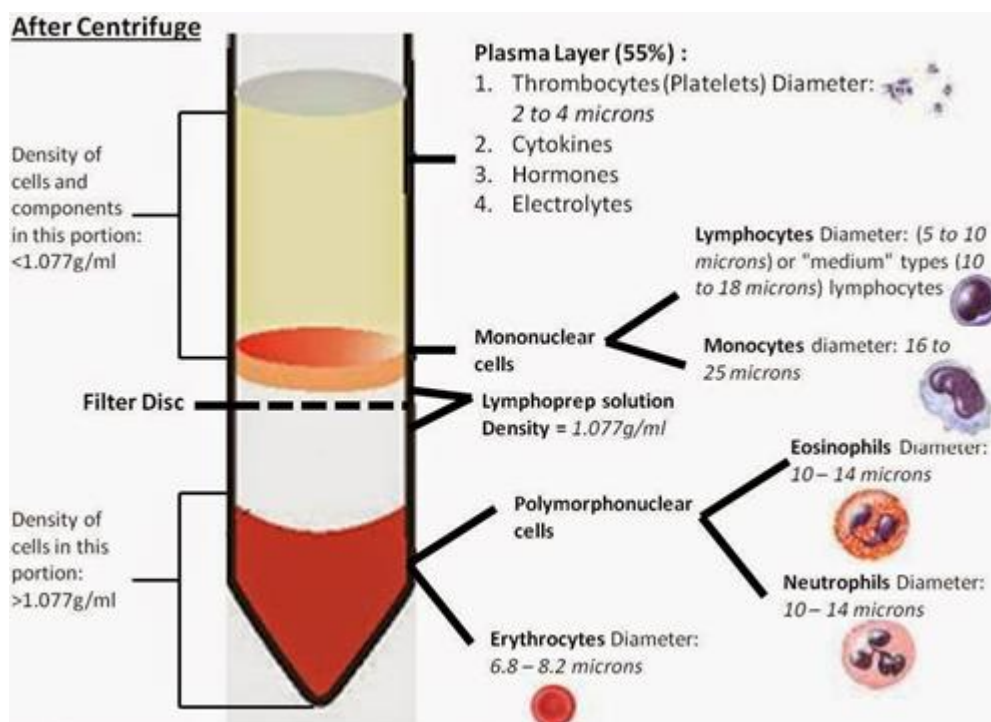
5.2.2 Određivanje direktnog testa utroška antihumanog globulina

Direktni test utroška antihumanog globulina je rađen metodom aglutinacije u epruveti. Paralelno su testirani uzorci pacijenata i kontrolne zdrave osobe. Test je podrazumevao nekoliko faza:

- a. Faza izdvajanja trombocita, leukocita i eritrocita kod pacijenta i zdrave osobe

U prvoj fazi se vršilo izdvajanje trombocita, leukocita i eritrocita centrifugiranjem mešavine 3ml periferne krvi pacijenta i 3ml rastvora fosfatnog pufera (PBS), koja se nalivala na 3ml fikol metrizata (limfoprep), u centrifugi

sa hlađenjem, 30 minuta na 1340 obrtaja/min ili 10 minuta na 2800 obrtaja/min (Slika 16). Pasterovom pipetom su se izdvajale gornje dve trećine plazme koja je odbacivana. Nakon toga se izdvajala plazma bogata trombocitima koja se nalazi neposredno iznad „oblačića“ mononuklearnih ćelija, koja se potom ulivala u prvu epruvetu. U drugu epruvetu su se izdvajali leukociti uzeti iz „oblačića“ mononuklearnih ćelija. Eritrociti su se izdvajali izvlačenjem eritrocita staklenom pipetom sa samog dna epruvete gde su se zbog relativno najveće specifične težine sedimentirali. Sve tri loze izolovanih ćelija bolesnika i kontrolne osobe su se prale jedanput u rastvoru PBS-a gde se supernatant odbacivao a sve tri loze ćelija su se resuspendovale u PBS-u do dovoljne količine od po 150 μ l za svaku od 9 epruveta sa titriranim AHG-om (po 1350 μ l za svaku krvnu lozu ćelija).



Izvor: Textbookhaematology4medical-scientist.blogspot.sg, 2014

Slika 16. Izdvajanje trombocita, leukocita i eritrocita dodavanjem limfoprepa i centrifugiranjem

- b. Faza senzibilizacije (adsorpcije) RhD pozitivnih eritrocita dobrovoljnih davaoca krvi sa IgG anti-D antiserumom

Senzibilizacija (adsorpcija) eritrocita dobrovoljnog davaoca ORhD(+) krvne grupe Rhf enotipa ccDEE, u količini od 150ml, se vršila dodavanjem iste količine (150ml) anti-D antiseruma IgG klase. Nakon inkubacije od 30 minuta na temperaturi 37⁰C, eritrociti su se prali 3x u fiziološkom rastvoru i pripremila se 3-5% suspenzija za rad.

- c. Faza kontakta trombocita, leukocita i eritrocita bolesnika i trombocita, leukocita i eritrocita kontrolne zdrave osobe sa razređenjima AHG

Titracija AHG seruma: Za svakog bolesnika je bio potreban jedan stalak sa epruvetama a jedan stalak sa epruvetama je bio potreban i za kontrolne ćelije zdrave osobe. Svaki stalak je sadržao epruvete poredane u 3 reda po 9 epruveta i obeležene od prve do devete oznakom $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$, $\frac{1}{128}$, $\frac{1}{256}$, $\frac{1}{512}$. U sve epruvete sva tri reda se nalivalo po 150 μ l fiziološkog rastvora a u prve epruvete sva tri reda se ukapavalo po 150 μ l AHG i vršila titracija AHG seruma prenošenjem po 150 μ l suspenzije u svaku sledeću epruvetu.

- d. Kontakt trombocita, leukocita i eritrocita sa titriranim AHG

U sve epruvete prvog reda sa titriranim AHG ukapavalo se po 150 μ l suspenzije trombocita, u sve epruvete drugog reda sa titriranim AHG ukapavalo po 150 μ l suspenzije leukocita i u sve epruvete trećeg reda sa titriranim AHG ukapavalo po 150 μ l suspenzije eritocita ispitanika. Nakon inkubacije od 6 minuta, vršilo se centrifugiranje na 1400 obrtaja/min, izdvajao se supernatant i prenosio u odgovarajuće obeležene epruvete sa oznakom $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$, $\frac{1}{128}$, $\frac{1}{250}$, $\frac{1}{512}$ u drugom stalku.

U ovoj fazi, eventualno prisutna antitela na površini eritrocita, trombocita ili leukocita pacijenta su vezala AHG (utrošila ga) i u sledećoj fazi uzrokovale

razliku u titru i utrošak AHG u odnosu na titar i utrošak AHG sa ćelijama zdrave kontrolne osobe.

- e. Faza titracije antihumanog imunoglobulina sa O RhD (+) eritrocitima prethodno senzibilisanim sa IgG anti-D antiserumom

U ovoj fazi su se dovodili u kontakt supernatanti dobijeni u prethodnoj fazi sa senzibilisanim (adsorbovanim) eritrocitima fenotipa ccDDEE, tako što se ukapavala po 1 kap 3% suspenzije eritrocita na 150 µl supernatanta dobijenog od razblaženja AHG sa eritrocitima, leukocitima i trombocitima. Epruvete su se centrifugirale na 1400 obrtaja/min i vršilo se očitavanje reakcije aglutinacije u svakoj epruveti posebno, na svetlosnom mikroskopu.

- f. Faza centrifugiranja i očitavanja rezultata pod mikroskopom

5.2.3 Interpretacija rezultata

Očitavanje se vršilo određivanjem razlike u titru antihumanog globulina: putem očitavanja postojeće reakcije aglutinacije dobijene u uzorcima pacijenta u odnosu na rezultate reakcije aglutinacije dobijene sa uzorcima zdrave kontrolne osobe. Test se smatrao pozitivnim ukoliko se dobijala razlika u titru AHG-a za bar dva razređenja sa pacijentovim ćelijama u odnosu na ćelije zdrave kontrolne osobe.

5.2.4 Određivanje vrednosti eritrocita, trombocita, leukocita, hemoglobina i hematokrita

Određivanje broja eritrocita se vršilo upotrebom turbidimetrijske metode koja se sastoji u dobijanju relativno ravnomerne i stabilne suspenzije eritrocita u izotoničnoj sredini, pri čemu je broj eritrocita u direktnom odnosu sa veličinom vrednosti ekstinkcije.

Brojanje leukocita se vršilo u komori za brojanje krvnih ćelija (Neubauerova metoda).

Određivanje broja trombocita se vršilo po metodi Brecher-Cronkitea, u Neubauerovoj komori.

Koncentracija hemoglobina se određivala kolorimetrijskom, cijanmethemoglobinskom metodom koja se zasniva na prevođenju hemoglobinskog gvožđa iz fero u feri oblik delovanjem fericijanida.

Hematokrit se određivao nakon centrifugiranja kapilarne cevčice koja je dve trećine svog volumena ispunjena krvlju, merenjem visine stuba eritrocita i plazme, te nakon toga određivanjem odnosa stuba eritrocita i celokupne krvi.

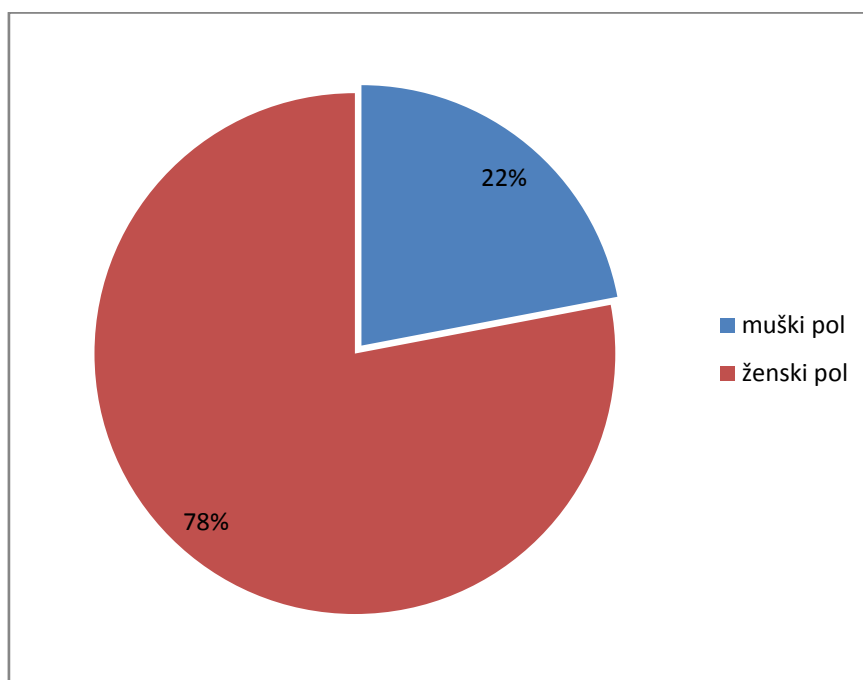
5.3 Metode statističke obrade podataka

Prikupljeni podaci su bili kodirani i uneseni u bazu podataka u personalnom računaru. Statistička obrada podataka vršila se statističkim paketom SPSS for Windows. Rezultati su prezentovani standardnim statističkim varijablama: srednja vrednost (\bar{x}), standardna devijacija (SD), koeficijent varijacije (CV), intervalne vrednosti (max i min). Ispitivanje statističke značajnosti između parametara pre i nakon primenjene terapije određivano Wilcoxonovim Z testom. Za neparametrijske podatke korišćen je X^2 test i Mann-Whitney test. Za ispitivanje korelacije korišćen je Spirmanov koeficijent korelacije. Analitički odnos među parametrima izražen je jednostrukom linearnom regresijom. Za sve statističke analize nivo poverenja je 0,05 ukoliko nije drugačije naznačeno. Rezultati su predstavljeni putem teksta, grafikona i tabela.

6. REZULTATI

U Laboratoriji za tipizaciju tkiva Zavoda za transfuziju krvi Vojvodine je sprovedeno istraživanje u koje je bilo uključeno 100 pacijenata oba pola sa dijagnostikovanom anemijom, limfoproliferativnim oboljenjem (Morbus Hodking, non-Hodgkin limfomi i hronična limfocitna leukemija), MDS-om, trombocitopenijom, TTP-om, ITP-om, sistemskim lupusom i miastenijom gravis.

Najveći procenat ispitanika su činili pacijenti ženskog pola sa udelom od 78,0%. Pacijenti stariji od 50 godina čine 81,0% ispitanika (Grafikon 1, Tabela 1).

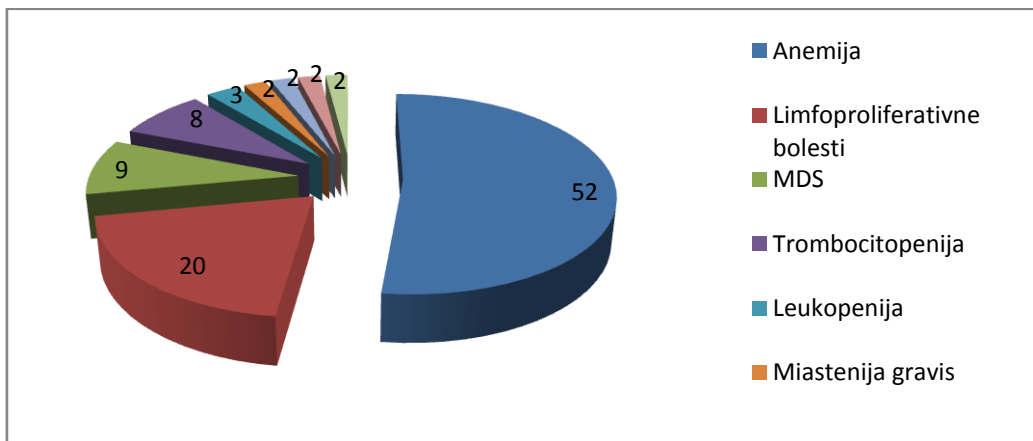


Grafikon 1. Struktura imunohepatoloških pacijenata prema polu

Tabela 1. Distribucija imunohepatoloških pacijenata po polu i starosti

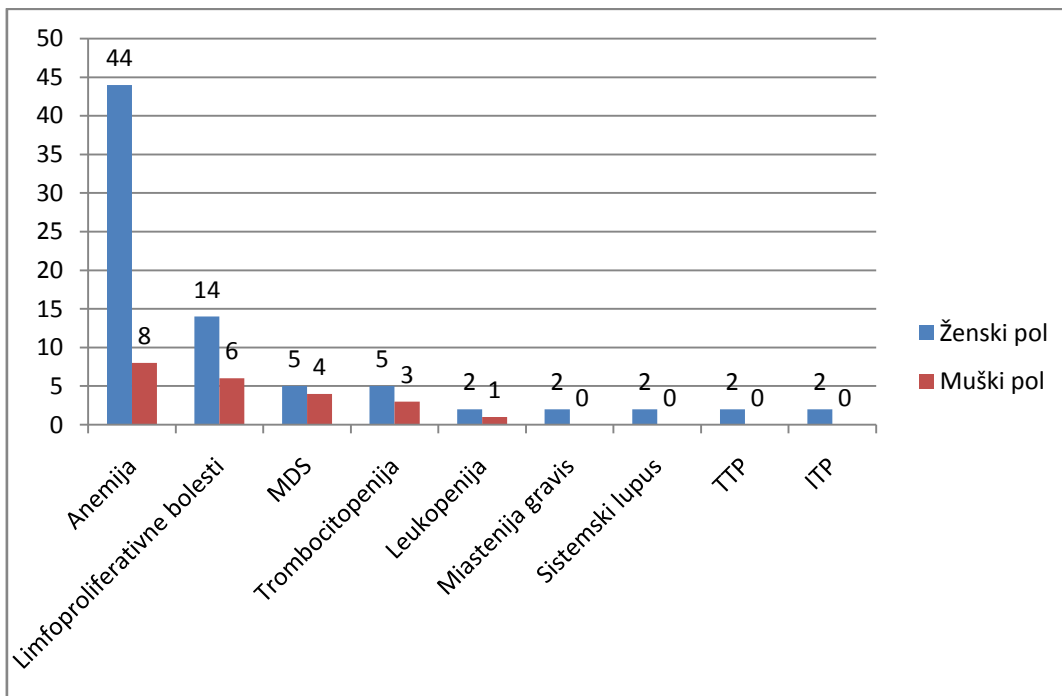
Starost	Žensko	%	Muško	%	Ukupno	%
20-34	6	85,7	1	14,3	7	100,0
35-49	8	66,7	4	33,3	12	100,0
50-64	41	80,1	10	19,9	51	100,0
65 +	23	76,7	7	23,3	30	100,0
Ukupno	78	78,0	22	22,0	100	100,0

Najzastupljeniji su bili pacijenti sa dijagnozom anemije (52%). Nakon toga, slede pacijenti sa dijagnozom limfoproliferativnih bolesti (20%), mijelodisplastičnog sindroma sa udelom od 9%, trombocitopenije 8%, leukopenije 3%, miastenije gravis, sistemskog lupusa, ITP-a i TTP-a sa udelom od 2% (Grafikon 2).



Grafikon 2. Distribucija oboljenja kod ispitivanih pacijenata (%)

Zastupljenost oboljenja među pacijentima po polu prikazana je na grafikonu 3.



Grafikon 3. Zastupljenost oboljenja po polu kod ispitivanih pacijenata

Uočava se da je najveći broj ispitanika među pacijentima sa dijagnozom anemije bio ženskog pola (44%).

Od 52 pacijenta sa dijagnozom anemije kod njih 11 (21,1%) DAT je pokazao pozitivnost a direktni test utroška AHG (DTU- AHG) na eritrocitima kod 24 (46,1%). (Tabela 2).

Tabela 2. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom anemije pre primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	3,1	95	0,28	0	0	162	0	4,5	0
2.	3,3	97	0,29	0	0	151	2	5,5	0
3.	2,7	65	0,20	1	128	142	2	5,6	0
4.	2,4	62	0,19	1	128	145	2	6,7	0
5.	3,9	100	0,30	0	0	150	0	5,2	0
6.	3,0	83	0,25	0	0	165	0	5,8	0
7.	3,8	90	0,27	0	0	210	0	7,8	0
8.	4,1	92	0,28	0	0	350	0	7,8	0
9.	4,3	90	0,27	0	0	345	0	7,4	0
10.	3,6	85	0,26	0	0	345	0	5,9	0
11.	4,5	92	0,28	0	0	251	0	6,4	0
12.	2,4	60	0,20	0	64	222	0	6,2	0
13.	2,6	65	0,20	1	128	215	0	5,5	0
14.	2,8	70	0,21	0	32	265	0	6,8	0
15.	3,1	85	0,26	0	32	350	0	7,6	0
16.	3,7	90	0,28	0	0	345	0	5,2	0
17.	3,3	85	0,26	1	256	321	0	7,9	0
18.	2,7	65	0,20	1	128	305	0	6,4	0
19.	2,0	63	0,21	1	256	387	0	4,8	0
20.	4,1	98	0,30	0	0	354	0	5,0	0
21.	3,9	85	0,26	0	16	324	0	6,3	0
22.	4,0	98	0,30	0	0	365	0	6,8	0
23.	3,6	90	0,30	0	0	325	0	7,8	0

24.	4,2	100	0,30	0	0	324	0	6,5	0
25.	3,5	97	0,29	0	0	300	0	6,6	0
26.	2,9	85	0,26	1	128	282	0	5,9	0
27.	4,1	95	0,28	0	0	278	0	5,8	0
28.	4,2	97	0,29	0	0	245	0	6,8	0
29.	3,8	96	0,28	0	2	264	0	5,0	0
30.	3,2	89	0,27	0	4	255	0	7,5	0
31.	3,7	90	0,27	0	0	287	0	7,1	0
32.	3,9	90	0,27	0	0	278	0	7,6	0
33.	4,5	100	0,30	0	0	241	0	6,9	0
34.	4,4	92	0,28	0	2	210	0	6,8	0
35.	4,2	98	0,28	0	0	222	0	5,5	0
36.	4,1	94	0,28	0	0	204	0	5,4	0
37.	4,0	90	0,27	0	0	302	0	4,0	0
38.	3,6	88	0,26	0	32	300	0	4,9	0
39.	3,8	90	0,30	0	2	250	0	5,0	0
40.	4,2	94	0,30	0	0	252	0	5,6	0
41.	2,4	78	0,24	1	128	211	0	8,9	0
42.	3,5	86	0,28	0	32	247	0	8,7	0
43.	3,2	84	0,26	0	16	248	0	7,5	0
44.	3,5	85	0,28	0	4	250	0	6,9	0
45.	4,2	98	0,29	0	0	330	0	8,0	0
46.	3,2	65	0,20	1	250	300	0	4,9	0
47.	3,4	90	0,26	0	0	320	0	4,7	0
48.	3,3	71	0,22	1	250	322	0	5,0	0
49.	4,1	92	0,28	0	4	333	0	9,1	0
50.	4,2	92	0,28	0	0	302	0	8,1	0
51.	4,3	100	0,30	0	0	300	0	6,5	0
52.	2,8	67	0,20	1	128	341	0	5,9	0

Kod tri pacijenta sa dijagnozom anemije detektovana su antitela na trombocitima (5,7%) dok na leukocitima nisu detektovana antitela ni na jednom uzorku.

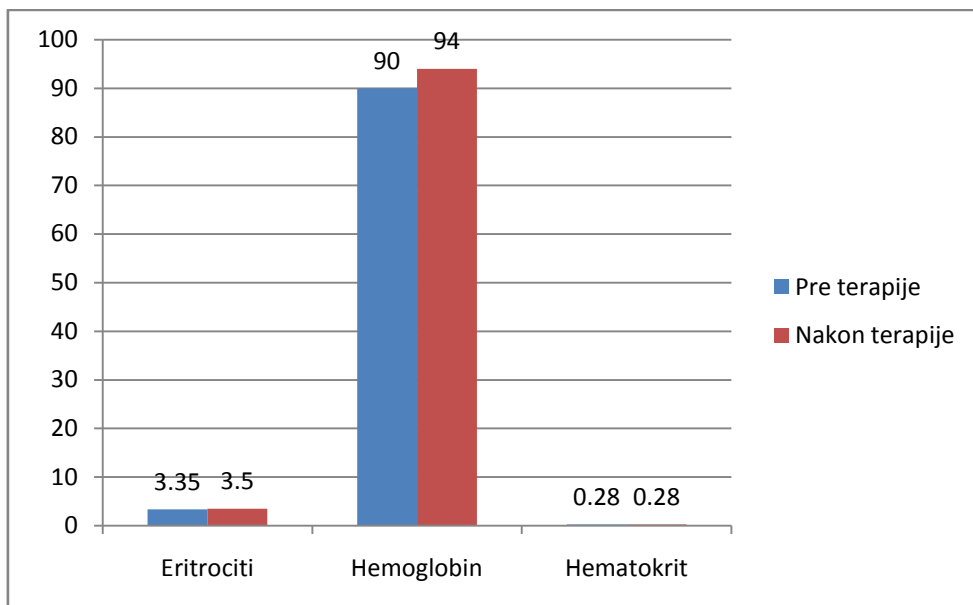
Nakon primljene terapije pozitivan DAT je i dalje ostao pozitivan kod istog broja pacijenata a DTU- AHG kod njih 19 (36,6%) (Grafikon 4). Na trombocitima je kod dva pacijenta registrovana prisutnost antitela a na leukocitima i nakon sprovedene terapije nije dijagnostikovana razlika u titru antitela (Tabela 3).

Tabela 3. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom anemije nakon primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	3,9	98	0,30	0	0	185	0	4,1	0
2.	4,5	100	0,30	0	0	174	0	5,3	0
3.	4,2	77	0,23	1	64	135	2	5,6	0
4.	4,0	70	0,22	1	64	140	2	6,4	0
5.	3,9	105	0,32	0	0	155	0	5,2	0
6.	3,2	87	0,26	0	0	178	0	5,3	0
7.	3,9	94	0,28	0	0	210	0	7,9	0
8.	4,1	100	0,30	0	0	355	0	7,8	0
9.	4,2	108	0,32	0	0	349	0	6,7	0
10.	3,7	85	0,26	0	0	349	0	5,9	0
11.	4,5	97	0,30	0	0	252	0	6,3	0
12.	3,2	75	0,22	0	16	221	0	5,7	0
13.	3,7	80	0,24	1	64	219	0	5,8	0
14.	3,0	72	0,21	0	64	285	0	6,8	0
15.	3,3	88	0,26	0	32	314	0	7,4	0
16.	5,1	96	0,28	0	0	354	0	5,3	0
17.	3,5	90	0,27	1	32	312	0	7,2	0
18.	3,1	73	0,22	1	16	301	0	6,2	0
19.	2,8	75	0,22	1	128	377	0	4,8	0
20.	4,0	105	0,32	0	0	351	0	5,1	0
21.	3,9	90	0,29	0	8	322	0	6,2	0
22.	4,1	96	0,26	0	0	369	0	6,2	0
23.	3,5	88	0,26	0	0	322	0	6,8	0
24.	4,4	108	0,34	0	0	329	0	6,1	0
25.	4,0	97	0,32	0	0	310	0	6,2	0

26.	3,4	88	0,28	1	128	283	0	6,3	0
27.	4,1	98	0,30	0	0	288	0	5,1	0
28.	4,2	94	0,30	0	0	244	0	7,1	0
29.	3,9	90	0,30	0	0	274	0	5,8	0
30.	3,4	93	0,28	0	2	259	0	5,4	0
31.	3,9	93	0,30	0	0	288	0	7,6	0
32.	3,9	92	0,30	0	0	290	0	6,1	0
33.	4,5	100	0,30	0	0	244	0	7,0	0
34.	4,4	105	0,28	0	0	201	0	7,1	0
35.	4,2	98	0,28	0	0	203	0	4,3	0
36.	4,1	94	0,28	0	0	210	0	5,9	0
37.	4,3	95	0,30	0	0	301	0	5,3	0
38.	3,9	93	0,26	0	16	306	0	4,1	0
39.	4,4	98	0,30	0	0	257	0	5,5	0
40.	4,3	100	0,30	0	0	252	0	4,1	0
41.	5,1	85	0,24	1	8	211	0	5,6	0
42.	3,8	91	0,28	0	16	247	0	8,9	0
43.	3,8	92	0,28	0	8	244	0	7,9	0
44.	4,4	110	0,34	0	0	224	0	5,2	0
45.	4,3	110	0,34	0	0	348	0	8,9	0
46.	3,5	74	0,22	1	128	314	0	4,3	0
47.	3,6	97	0,29	0	0	328	0	5,1	0
48.	3,9	86	0,26	1	64	311	0	5,8	0
49.	4,3	98	0,30	0	0	321	0	9,0	0
50.	4,5	102	0,30	0	0	344	0	8,8	0
51.	4,7	109	0,33	0	0	312	0	6,7	0
52.	3,3	78	0,24	1	32	314	0	5,8	0

Kod ispitivanih pacijenata pacijenata sa dijagnozom anemije primetne su promene u hematološkim vrednostima nakon primljene terapije.



Grafikon 4. Prosečne vrednosti eritrocita, hemoglobina i hematokrita pre i nakon primljene terapije kod pacijenata sa dijagnozom anemije

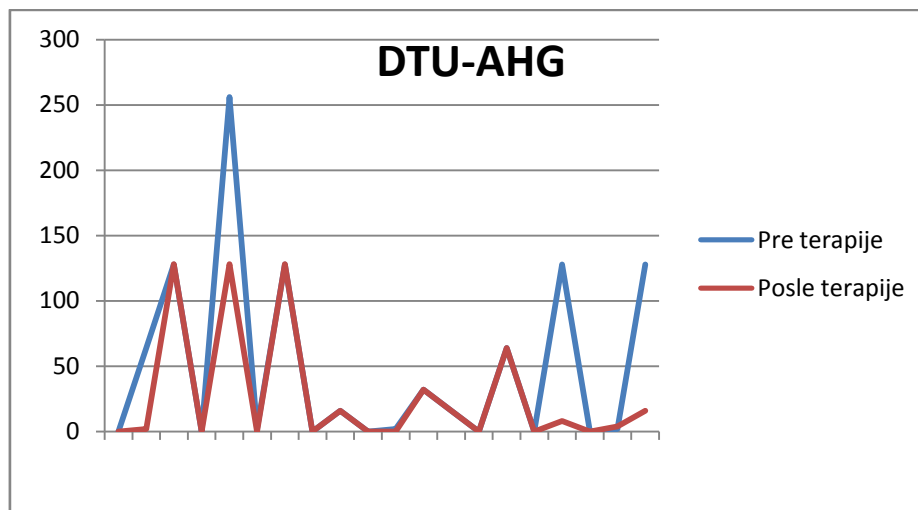
Prosečne vrednosti eritrocita su veće za $0,20 \times 10^{12}/l$, hemoglobina za $4g/l$, a vrednosti hematokrita su ostale iste nakon terapije (Grafikon 4).

Od 20 pacijenata sa dijagnozom limfoproliferativne bolesti prilikom prvog testiranja pre primljene terapije, kod njih 7 (35%) DAT je pokazao pozitivnost a direktni test utroška AHG (DTU -AHG) sa eritrocitima kod njih 13 (65%). Kod 14 pacijenata (70%) dijagnostikovana je razlika u titru u reakciji sa trombocitima u manjem ili većem stepenu dok su na leukocitima pacijenata detektovana antitela u četiri uzorka (20%) (Tabela 4, Grafikon 5).

Tabela 4. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom limfoproliferativnih bolesti pre primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	4,2	110	0,34	0	0	14	0	5,2	0
2.	4,3	85	0,26	1	64	10	0	15,3	0
3.	4,0	87	0,28	1	128	16	0	22,3	2
4.	5,1	92	0,30	0	0	50	128	24	0
5.	3,1	65	0,20	1	256	2	0	65	0
6.	3,9	95	0,30	0	2	43	128	17,1	0
7.	2,9	75	0,23	1	128	100	256	89	4
8.	3,1	90	0,28	0	0	26	128	42,4	2
9.	3,0	95	0,30	0	16	23	128	86	0
10.	3,2	100	0,30	0	0	77	64	81	0
11.	4,4	95	0,30	0	2	88	64	88	2
12.	4,0	90	0,28	0	32	30	32	14	0
13.	3,4	98	0,30	0	16	10	0	25	0
14.	4,6	95	0,28	0	0	80	16	18	0
15.	3,1	94	0,28	1	64	85	16	6,1	0
16.	4,9	95	0,38	0	0	29	128	4,5	0
17.	3,5	74	0,23	1	128	24	256	14,1	0
18.	3,0	89	0,28	0	0	8	0	15,0	0
19.	3,3	88	0,27	0	2	45	256	14,2	0
20.	2,8	75	0,22	1	128	35	256	16,4	0

Kod pacijenata sa dijagnozom limfoproliferativnih bolesti kojima je DAT pozitivan i razlika u titru DTU-AHG je velika pre primljene terapije.



Grafikon 5. Vrednosti titra DTU-AHG sa eritrocitima pre i nakon primljene terapije kod pacijenata sa dijagnozom limfoproliferativne bolesti

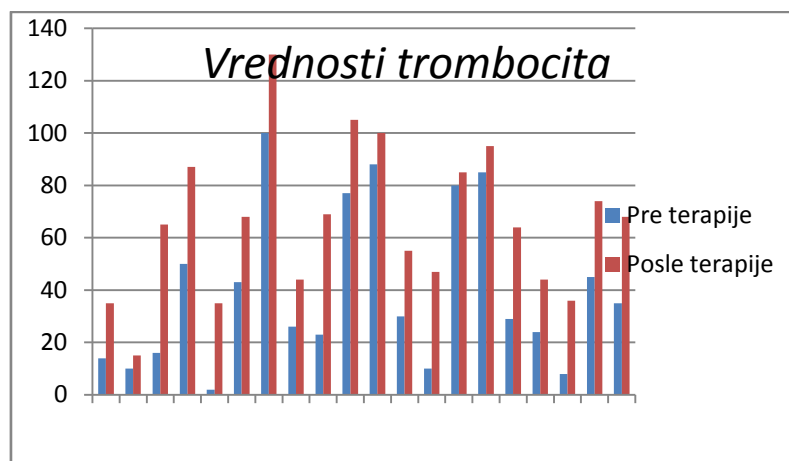
Uočava se da je razlika u titru DTU-AHG kod pacijenata sa limfoproliferativnim oboljenjem veća pre terapije nego nakon primljene terapije.

Od 20 pacijenata sa dijagnozom limfoproliferativne bolesti prilikom testiranja nakon primljene terapije, kod njih 5 (25%) DAT je pokazao pozitivnost a direktni test utroška AHG (DTU- AHG) na eritrocitima kod njih 13 (65%). Kod 14 pacijenata (70%) su detektovana antitela na trombocitima dok su na leukocitima detektovana antitela u četiri uzorka (20%) (Tabela 5). Vrednosti trombocita pre i posle terapije kao i razlika u titru DTU-AHG sa trombocitima prikazana je na grafikonu 6 i 7.

Tabela 5. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom limfoproliferativnih bolesti nakon primljene terapije

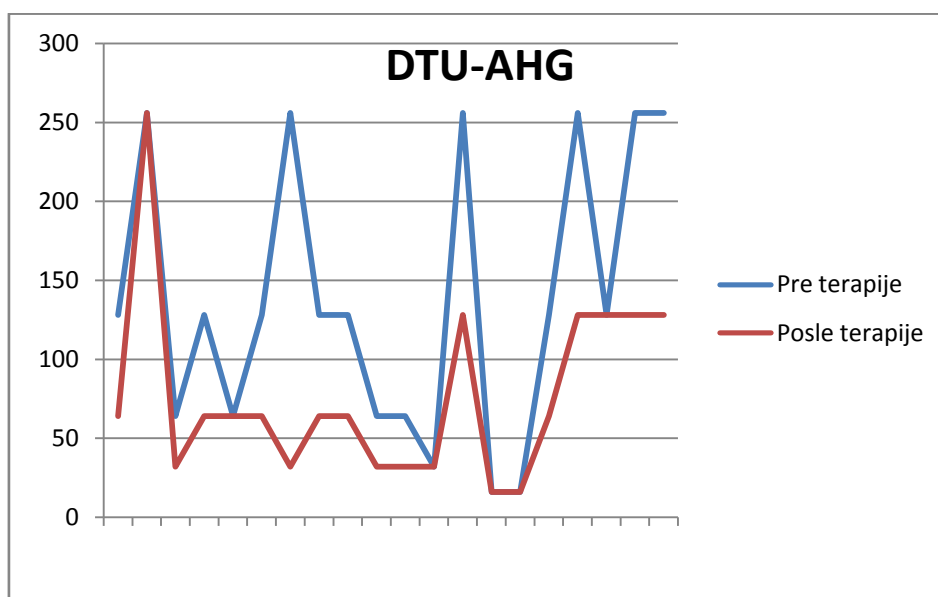
Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	3,2	110	0,34	0	0	35	0	5,1	0
2.	3,7	89	0,28	0	2	15	0	13,1	0
3.	3,8	88	0,24	1	128	65	0	20,3	2
4.	3,4	95	0,30	0	0	87	64	18,3	0
5.	4,1	69	0,22	1	128	35	0	44	0
6.	3,3	100	0,30	0	0	68	64	13,1	0
7.	4,4	77	0,24	1	128	130	32	67	4
8.	3,1	93	0,30	0	0	44	64	33,4	2
9.	3,0	98	0,30	0	16	69	64	44	0
10.	4,5	105	0,32	0	0	105	32	32	0
11.	3,3	98	0,30	0	0	100	32	65	2
12.	4,0	93	0,28	0	32	55	32	11,2	0
13.	3,5	98	0,28	0	16	47	0	22,3	0
14.	3,3	97	0,28	0	0	85	16	14	0
15.	3,8	98	0,28	1	64	95	16	5,7	0
16.	3,9	92	0,30	0	0	64	64	4,3	0
17.	4,1	80	0,24	0	8	44	128	11,7	0
18.	4,4	95	0,30	0	0	36	0	13,4	0
19.	4,1	98	0,30	0	4	74	128	12,3	0
20.	3,9	81	0,24	1	16	68	128	14,9	0

U Tabeli 5 uočavaju se smanjene razlike u titru kod DTU-AHG nakon terapije kod pacijenata kojima je i dalje pozitivan DAT.



Grafikon 6. Vrednosti trombocita pre i posle terapije kod pacijenata sa dijagnozom limfoproliferativne bolesti

Vrednosti trombocita su veće nakon primljene terapije kod pacijenata sa limfoproliferativnim oboljenjem (Grafikon 6).



Grafikon 7. Vrednosti titra DTU-AHG sa trombocitima pre i posle terapije kod pacijenata sa dijagnozom limfoproliferativne bolesti

Razlika u titru DTU-AHG sa trombocitima je značajno niža nakon primljene terapije.

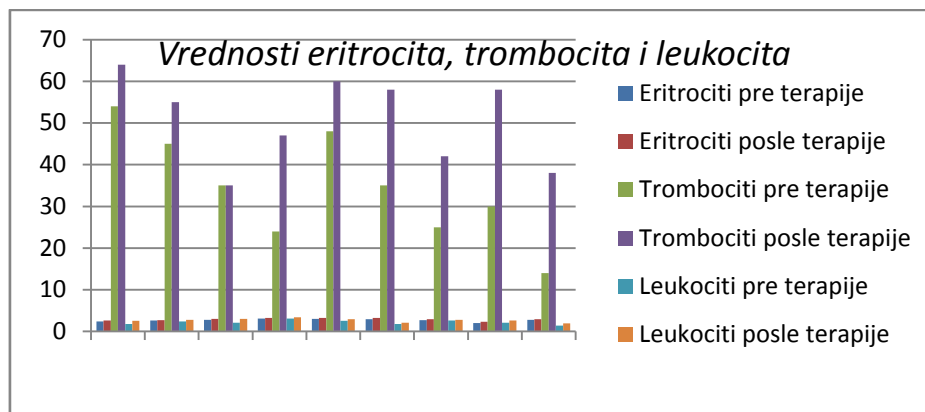
Od 9 pacijenata sa dijagnozom mijelodisplastičnog sindroma prilikom prvog testiranja pre primljene terapije, kod dvoje je DAT pokazao pozitivnost a direktni test utroška AHG (DTU -AHG) na eritrocitima kod njih 6. Kod 5 pacijenata su detektovana antitela na trombocitima, dok su na leukocitima detektovana antitela u šest uzoraka (Tabela 6).

Tabela 6. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom mijelodisplastičnog sindroma pre primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	3,4	60	0,18	0	32	54	16	1,8	0
2.	3,6	65	0,19	0	64	45	32	2,4	32
3.	3,8	70	0,22	1	128	35	16	2,1	16
4.	4,1	85	0,26	0	64	24	0	3,1	16
5.	4,0	90	0,28	0	0	48	8	2,5	0
6.	3,9	85	0,28	0	0	35	8	1,8	0
7.	3,7	65	0,19	0	64	25	0	2,6	64
8.	3,8	63	0,19	1	250	30	0	2,1	16
9.	4,3	75	0,22	0	0	14	0	1,4	128

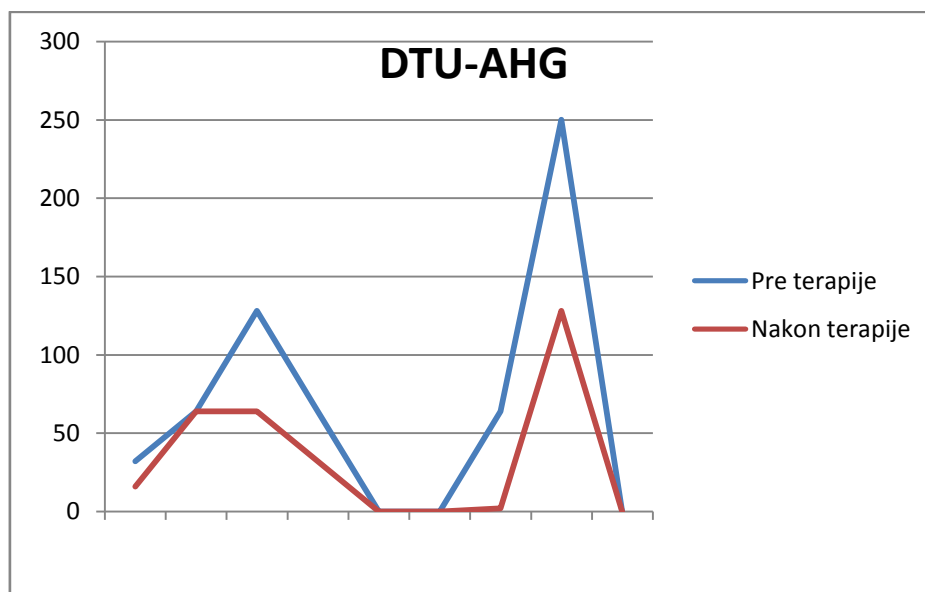
Rezultati istraživanja ukazuju da je razlika u titru DTU-AHG kod pacijenata sa dijagnozom mijelodisplastičnog sindroma sa pozitivnim DAT-om veća nego kod pacijenata sa negativnim.

Vrednosti eritrocita, leukocita i trombocita kao i promene titra DTU-AHG sa eritrocitima pre i posle terapije prikazani su na Grafikonu 8 i 9.



Grafikon 8. Vrednosti eritrocita, trombocita i leukocita pre i posle terapije kod pacijenata sa dijagnozom MDS-a

Uočljiv je primetan porast svih krvnih loza nakon primljene terapije kod pacijenata sa dijagnozom MDS-a (Grafikon 8) dok je razlika u titru DTU-AHG značajno niža nakon terapije u odnosu na vrednosti pre terapije (Grafikon 9).



Grafikon 9. Razlike u titru DTU-AHG sa eritrocitima pre i posle terapije kod pacijenata sa dijagnozom MDS-a.

Nakon primljene terapije, došlo je do promene razlike u titru DTU-AHG sa eritrocitima, trombocitima i leukocitima (Tabela 7).

Tabela 7. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom mijelodisplastičnog sindroma nakon primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	3,5	70	0,22	0	16	64	16	2,5	0
2.	3,5	65	0,19	0	64	55	16	2,8	16
3.	3,9	75	0,22	1	64	35	16	3,0	8
4.	4,0	92	0,28	0	32	47	4	3,4	8
5.	4,3	90	0,28	0	0	60	2	2,9	0
6.	3,9	85	0,28	0	0	58	4	2,1	0
7.	3,8	72	0,22	0	2	42	64	2,8	32
8.	3,7	70	0,21	1	128	58	16	2,6	16
9.	4,1	77	0,24	0	0	38	32	1,9	64

Nakon primljene terapije došlo je do porasta hematoloških parametara, kao i smanjenja razlika u titru DTU-AHG u pacijenata sa dijagnozom mijelodisplastičnog sindroma.

Od 8 pacijenata sa dijagnozom trombocitopenije, prilikom prvog i drugog testiranja nijedan nije imao pozitivan DAT i DTU-AHG sa eritrocitima. DTU-AHG sa leukocitima prilikom prvog testiranja, detektovao je antitela u niskom titru kod jednog pacijenta koja nisu detektovana na leukocitima prilikom narednog testiranja. Kod 5 pacijenata (62,5%) su detektovana antitela na trombocitima i prilikom prvog i prilikom drugog testiranja. (Tabela 8 - 9, Grafikon 10).

Tabela 8. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom trombocitopenije pre primljene terapije

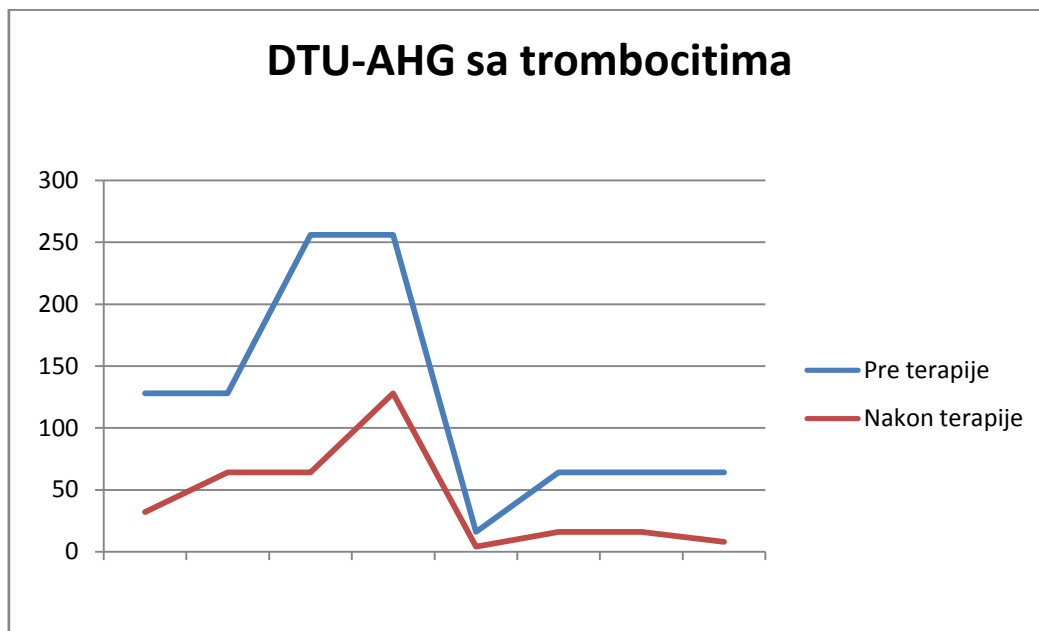
Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	3,8	110	0,33	0	0	85	128	6,2	0
2.	3,9	115	0,35	0	0	77	128	5,5	4
3.	4,1	120	0,36	0	0	63	0	6,8	0
4.	4,5	125	0,38	0	0	44	256	7,6	0
5.	5,2	135	0,40	0	0	110	0	5,2	0
6.	5,4	141	0,42	0	0	58	64	7,9	0
7.	5,0	132	0,38	0	0	87	64	6,4	0
8.	4,1	128	0,38	0	0	95	0	4,8	0

Uočava se da se putem DTU-AHG detektovala relativno velika razlika u titru sa trombocitima a time i prisustvo antitela na trombocitima kod pacijenata sa dijagnozom trombocitopenije pre primljene terapije (Tabela 8).

Tabela 9. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG u pacijenata sa dijagnozom trombocitopenije nakon primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	3,7	110	0,40	0	0	105	32	6,1	0
2.	3,9	114	0,38	0	0	96	64	5,6	0
3.	4,1	122	0,36	0	0	87	0	6,8	0
4.	4,5	120	0,38	0	0	65	128	7,7	0
5.	5,1	134	0,40	0	0	135	0	5,0	0
6.	5,4	142	0,42	0	0	89	16	7,9	0
7.	5,0	135	0,36	0	0	95	16	6,0	0
8.	4,1	125	0,38	0	0	110	0	4,8	0

Uočava se da se putem DTU-AHG detektovala manja razlika u titru na trombocitima u pacijenata sa dijagnozom trombocitopenije nakon primljene terapije (Tabela 9).



Grafikon 10. Razlike u titru DTU-AHG sa trombocitima pre i posle terapije kod pacijenata sa dijagnozom trombocitopenije

U Grafikonu 10 primetan je značajan pad razlike u titru DTU-AHG sa trombocitima nakon primenjene terapije.

Od 2 pacijenata sa dijagnozom trombotične trombocitopenijske purpure, prilikom prvog i drugog testiranja nijedan nije imao pozitivan DAT kao ni DTU-AHG sa leukocitima. DTU-AHG sa trombocitima i eritrocitima je u oba slučajeva detektovao antitela prilikom prvog testiranja kao i prilikom narednog testiranja (Tabela 10, 11).

Tabela 10. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom trombotične trombocitopenijske purpure pre primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	3,7	65	0,20	0	16	8	64	6,3	0
2.	4,2	77	0,22	0	8	24	32	7,5	0

U Tabeli 10. uočava se da je putem DTU-AHG testa detektovano prisustvo antitela na eritrocitima i trombocitima i kod pacijenata sa negativnim DAT-om.

Tabela 11. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom trombotične trombocitopenijske purpore nakon primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	3,9	79	0,24	0	8	25	32	6,2	0
2.	4,4	85	0,25	0	4	45	8	6,6	0

Nakon primljenje terapije razlika u titru DTU-AHG na eritrocitima i trombocitima kod pacijenata sa negativnim DAT-om je manja u odnosu na razliku u titru DTU-AHG pre terapije.

Od 2 pacijenata sa dijagnozom idiopatske trombocitopenične purpore prilikom prvog i drugog testiranja nijedan nije imao pozitivan DAT kao ni DTU-AHG sa leukocitima. DTU-AHG sa trombocitima i eritrocitima je u oba slučajeva detektovao antitela prilikom prvog testiranja kao i prilikom narednog testiranja (Tabela 12, 13).

Tabela 12. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom idiopatske trombocitopenične purpore pre primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	3,9	75	0,22	0	64	8	64	7,9	0
2.	4.0	84	0,25	0	32	14	64	6,5	0

DTU-AHG testom detektovana je relativno velika razlika u titru pre primljene terapije i time prisustvo antitela na eritorocitima i trombocitima (Tabela 12). Nakon

primljene terapije primetan je pad razlike u titru DTU-AHG i na eritrocitima i na trombocitima (Tabela 13).

Tabela 13. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom idiopatske trombocitopenične purpure nakon primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	3,9	88	0,25	0	32	15	32	6,3	0
2.	4,1	95	0,28	0	16	14	64	6,6	0

Od 3 pacijenata sa dijagnozom leukopenije prilikom prvog i drugog testiranja nijedan nije imao pozitivan DAT i DTU-AHG sa eritrocitima i trombocitima dok je kod jednog pacijenta uočena prisutnost antitela na leukocitima koja se zadržala i prilikom narednog testiranja. (Tabela 14, 15).

Tabela 14. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom leukopenije pre primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	4,5	130	0,40	0	0	250	0	3,6	0
2.	3,8	115	0,36	0	0	175	0	2,1	16
3.	4,1	135	0,40	0	0	150	0	2,0	0

Putem DTU-AHG detektovana su samo antitela na leukocitima kod jednog pacijenta (Tabela 14).

Tabela 15. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom leukopenije nakon primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	4,5	128	0,40	0	0	255	0	5,5	0
2.	3,8	118	0,36	0	0	170	0	2,2	16
3.	4,1	135	0,40	0	0	156	0	3,0	0

Kodpacijenata sa dijagnozom leukopenije nakon terapije razlika u titru DTU-AHG je ostala ista.

Od 2 pacijenata sa dijagnozom miastenije gravis, prilikom prvog i drugog testiranja nijedan nije imao pozitivan DAT. DTU-AHG sa eritrocitima, trombocitima i leukocitima je detektovao antitela prilikom prvog testiranja i detektovao ih u identičnom titru i prilikom narednog testiranja. (Tabela 16, 17).

Tabela 16. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom miastenije gravis pre primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	4,1	95	0,28	0	4	145	2	4,2	2
2.	4,4	105	0,30	0	4	135	2	5,1	2

Razlika u titru antitela DTU-AHG primetna je i u reakciji sa trombocitima i sa leukocitima pre primenjene terapije.

Tabela 17. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom miastenije gravis nakon primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	4,0	96	0,28	0	4	158	2	4,9	2
2.	4,5	110	0,33	0	4	143	2	4,8	2

Nakon primljene terapije nisu uočene promene u razlikama titra DTU-AHG ni sa trombocitima ni sa leukocitima.

Od 2 pacijenata sa dijagnozom sistemskog lupusa, prilikom prvog i drugog testiranja nijedan nije imao pozitivan DAT kao ni DTU-AHG sa leukocitima. DTU-AHG sa trombocitima i eritrocitima je u oba slučaja detektovao antitela prilikom prvog testiranja kao i prilikom narednog testiranja (Tabela 18, 19).

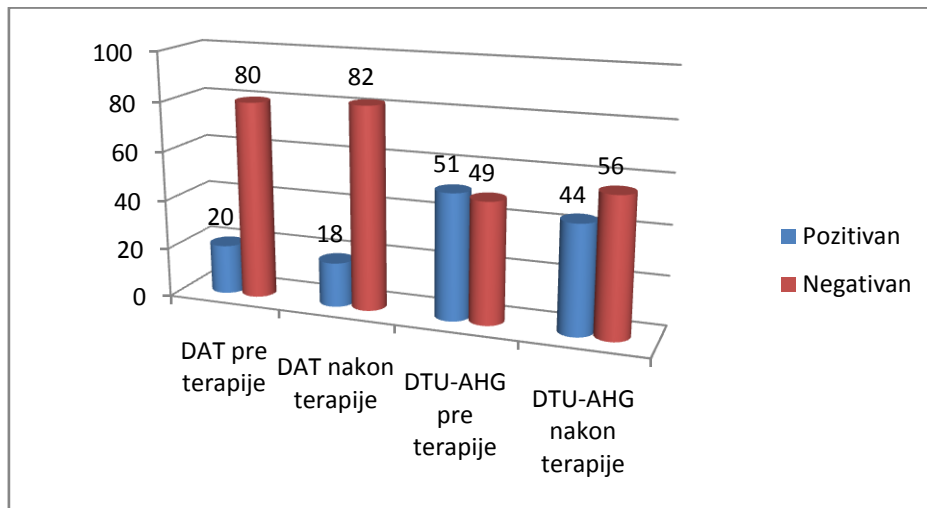
Tabela 18. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom sistemskog lupusa pre primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	3,8	70	0,22	0	16	98	32	4,3	0
2.	4,1	85	0,25	0	8	105	16	5,2	0

Tabela 19. Hematološke vrednosti i rezultati DAT i DTU- AHG kod pacijenata sa dijagnozom sistemskog lupusa nakon primljene terapije

Pacijent	Erc x10 ¹² g/l	Hgb g/l	Htc l/l	DAT	AHG (Erc)	Trc x10 ⁹ g/l	AHG (Trc)	Leu x10 ⁹ g/l	AHG (Leu)
1.	3,9	85	0,25	0	16	95	32	4,7	0
2.	4,3	90	0,27	0	8	110	8	4,5	0

Od 100 ispitivanih pacijenata prilikom inicijalnog testiranja pre primljene terapije DAT je bio pozitivan kod 20 a DTU-AHG kod 51 pacijenta. Nakon primljene terapije njih 18 je imalo pozitivan DAT a DTU-AHG 44 (Grafikon 11).



Grafikon 11. Vrednosti DAT-a i DTU-AHG pre i posle terapije

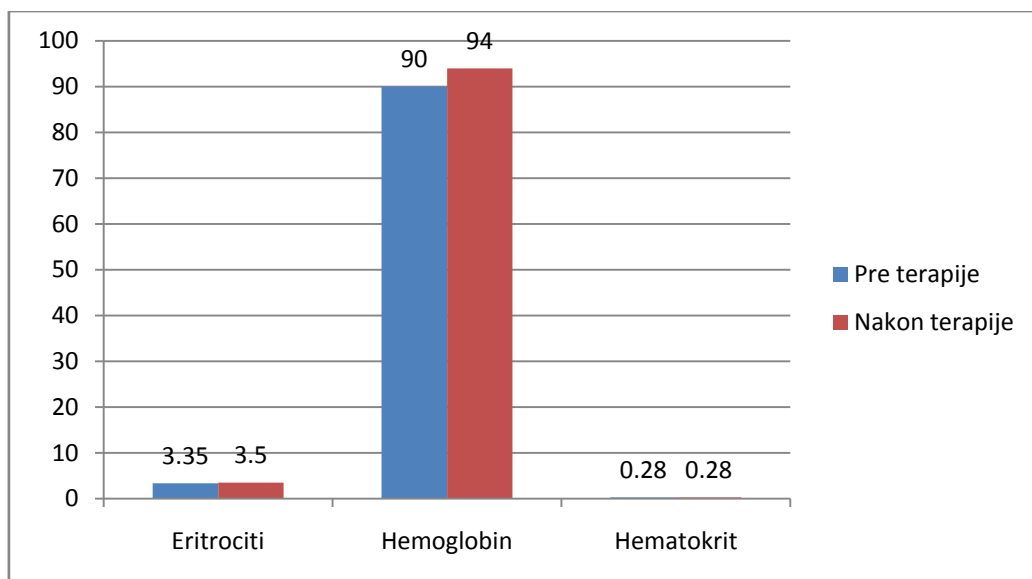
U Tabeli 20 i Grafikonu 12 prikazane su prosečne vrednosti merenih parametara. Od proseka računata je aritmetička sredina ($\bar{x} \pm SD$) i medijana. Kako je veliki raspon između minimuma i maksimuma na većini vrednosti, mediana se razlikuje od aritmetičke sredine. Iz tog razloga, aritmetička sredina nije prava mera proseka, zbog čega je korišćena medijana.

Kao i kod vrednosti parametara pre terapije, i kod vrednosti nakon terapije relevantne su vrednosti medijane (Tabela 21).

Sve ispitivane vrednosti pre i posle terapije se razlikuju. Posmatrajući medijanu ispitivanih parametara, uočeno je njeno povećanje nakon terapije kod svih parametara osim kod hematokrita gde su vrednosti ostale nepromenjene i kod leukocita gde je došlo do smanjenja vrednosti.

Tabela 20. Prosečne vrednosti merenih parametrov pre primenjene terapije

	N	Min	Max	\bar{x}	SD	Mediana
Pre primljene terapije: Erc	100	2,00	5,40	3,44	0,67	3,35
Pre primljene terapije: Hgb	100	60,00	141,00	89,85	17,44	90,00
Pre primljene terapije: Htc	100	0,18	0,42	0,27	0,05	0,28
Pre primljene terapije: Trc	100	2,00	455,00	176,43	125,70	170,00
Pre primljene terapije: Leu	100	1,40	89,00	11,19	17,32	6,40



Grafikon 12. Vrednosti eritrocita, hemoglobina i hematokrita pre i nakon primljene terapije

Tabela 21. Prosečne vrednosti merenih parametara nakon primenjene terapije

	N	Min	Max	\bar{x}	SD	Mediana
Nakon primljene terapije: Erc	100	2,30	5,40	3,61	0,60	3,50
Nakon primljene terapije: Hgb	100	65,00	142,00	94,78	15,38	94,00
Nakon primljene terapije: Htc	100	0,19	0,42	0,28	0,04	0,28
Nakon primljene terapije: Trc	100	15,00	441,00	186,47	115,67	181,50
Nakon primljene terapije: Leu	100	1,90	67,00	9,15	10,90	6,10

Kako je DAT jedina varijabla koja je kategorička, prikazana je preko frekvencije i procenata. Pre primljene terapije pozitivan DAT imalo je 20 pacijenata (20%), a nakon terapije pozitivan DAT imalo je 18 pacijenata (18%) (Tabela 22 i 23).

Tabela 22. Pozitivnost DAT-a pre primljene terapije

	Frekvencija	Procenat
Negativan	80	80,0
Pozitivan	20	20,0
Total	100	100,0

Tabela 23. Pozitivnost DAT-a nakon primljene terapije

	Frekvencija	Procenat
Negativan	82	82,0
Pozitivan	18	18,0
Total	100	100,0

Sprovedeno je poređenje rezultata testiranja direktnog testa utroška antihumanog globulina i direktnog antiglobulinskog testa kod pacijenata pre i posle primljene terapije i na osnovu dobijenih rezultata utvrđivano je da li je osetljiviji test utroška antihumanog globulina ili direktni antiglobulinski test (Tabela 24).

Tabela 24. Vrednosti razlike u titru DTU-AHG pre i nakon primljene terapije

	Min	Max	\bar{x}	SD	Median	Z	p
Pre primljene terapije: AHG(erc)	0,00	256,00	39,02	68,83	2,00	-5,17	0,000
Nakon primljene terapije: AHG(erc)	0,00	128,00	20,94	38,70	0,00		
Pre primljene terapije: AHG(leu)	0,00	128,00	4,38	16,31	0,00	-2,37	0,018
Nakon primljene terapije: AHG(leu)	0,00	64,00	2,66	8,83	0,00		
Pre primljene terapije: AHG(trc)	0,00	256,00	42,58	74,98	0,00	-4,94	0,000
Nakon primljene terapije: AHG(trc)	0,00	256,00	21,34	41,55	0,00		

Vrednosti razlike u titru DTU-AHG sa eritrocitima statistički se značajno razlikuju pre i nakon terapije ($Z=-5,17$, $p=0,000$). Veća vrednost je dobijena pre nego nakon terapije. I vrednosti razlike u titru DTU-AHG sa leukocitima statistički se značajno razlikuju pre i nakon terapije ($Z=-2,37$, $p=0,018$). Veća vrednost je dobijena pre nego nakon terapije.

U titru DTU-AHG sa trombocitima statistički značajno ($Z=-4,94$, $p=0,000$) je veća vrednost dobijena pre nego nakon terapije.

Poređenje vrednosti praćenih parametara krvne slike pre i nakon primljene terapije prikazano je u Tabeli 25.

Tabela 25. Vrednosti praćenih parametara krvne slike pre i nakon primljene terapije

	Min	Max	\bar{x}	SD	Median	Z	p
Pre primljene terapije: Erc	2,00	5,40	3,44	0,67	3,35	-6,73	0,000
Nakon primljene terapije: Erc	2,30	5,40	3,61	0,60	3,50		
Pre primljene terapije: Trc	2,00	455,00	176,43	125,70	170,00	-5,60	0,000
Nakon primljene terapije: Trc	15,00	441,00	186,47	115,67	181,50		
Pre primljene terapije: Leu	1,40	89,00	11,19	17,32	6,40	-3,10	0,002
Nakon primljene terapije: Leu	1,90	67,00	9,15	10,90	6,10		
Pre primljene terapije: Hgb	60,00	141,00	89,85	17,44	90,00	-7,32	0,000
Nakon primljene terapije: Hgb	65,00	142,00	94,78	15,38	94,00		
Pre primljene terapije: Htc	0,18	0,42	0,27	0,05	0,28	-5,31	0,000
Nakon primljene terapije: Htc	0,19	0,42	0,28	0,04	0,28		

Sve ispitivane vrednosti pre i nakon terapije statistički se značajno razlikuju. Naime, eritrociti ($Z=-6,73$, $p=0,000$) kao i trombociti ($Z=-5,60$, $p=0,000$) imaju statistički značajnu veću vrednost nakon terapije nego pre terapije. Leukociti imaju veću vrednost pre nego nakon terapije ($Z=-3,10$, $p=0,002$) dok hemoglobin ima veću vrednost nakon terapije ($Z=-7,32$, $p=0,000$). Iako su vrednost hematokrita pre i nakon terapije vrlo slične, ipak je uočena razlika statistički značajna ($Z=-5,31$, $p=0,000$).

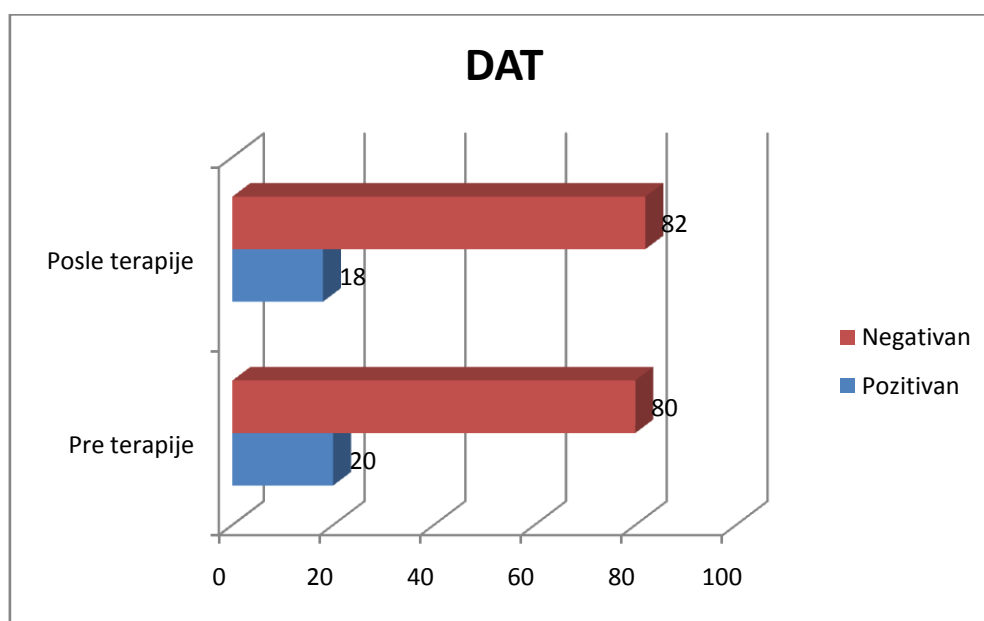
Razlika u rezultatima DAT-a pre i nakon primljene terapije prikazana je u Tabeli 26 i na Grafikonu 13.

Tabela 26. Razlika u pozitivnosti DAT-a pre i nakon primljene terapije

			Nakon primljene terapije:		Total
			DAT		
			Negativan	Pozitivan	
Pre primljene terapije: DAT	Negativan	Ukupno	80	0	80
		%	100,0	0,0%	100,0
	Pozitivan	Ukupno	2	18	20
		%	10,0	90,0%	100,0
Total		Ukupno	82	18	100
		%	82,0	18,0	100,0

$\chi^2=87,80$, $df=1$, $p=0,000$

Od 20 pacijenata sa pozitivnim DAT-om kod 2 se izgubila pozitivnost nakon primljene terapije.



Grafikon 13. Razlika u pozitivnosti DAT-a pre i nakon primljene terapije

Postoji statistički značajna razlika DAT pre i nakon terapije ($\chi^2=87,80$, $df=1$, $p=0,000$). Naime, od ukupnog broja pacijenata sa pozitivnim DAT-om pre terapije, nakon terapije je 18 pozitivnih pacijenata, a 2 negativna. Kod svih pacijenata koji su imali negativan DAT pre terapije, DAT je i nakon terapije ostao negativan.

Utvrđivanje povezanosti između citopenije i stepena utroška antihumanog globulina pre i posle terapije prikazano je u tabelama 27 i 28.

Tabela 27. Povezanost citopenije i stepena utroška AHG-a pre terapije

Zavisna varijabla	Nezavisna varijabla	Adjusted R ²	F(p)	β	p
Pre primljene terapije: AHG(erc)	Erc	0,262	36,07(0,000)	-0,519	0,000
Pre primljene terapije: AHG(erc)	Hgb	0,336	49,48(0,000)	-0,579	0,000
Pre primljene terapije: AHG(erc)	Htc	0,323	46,70(0,000)	-0,568	0,000
Pre primljene terapije: AHG(trc)	Trc	0,375	60,31(0,000)	-0,617	0,000
Pre primljene terapije: AHG(leu)	Leu	0,014	15,41(0,015)	-0,119	0,237

Sprovedena je jednostruka linearna regresija, kako bi se ocenio uticaj vrednosti eritrocita na DTU-AHG (sa eritrocitima). Model je statistički značajan (F=36,07, p=0,000). Vrednosti eritrocita utiču na DTU-AHG (sa eritrocitima) (β=-0,519, p=0,000), objašnjavajući 26% zavisne varijable (R²=0,262).

Ispitali smo i da li koncentracija hemoglobina utiče na DTU-AHG (sa eritrocitima). Značajnost standardizovanog β koeficijenta pokazuje da uticaj postoji (β=-0,579, p=0,000), objašnjavajući 33% zavisne varijable (R²=0,336).

I vrednosti hematokrita utiče na DTU-AHG (sa eritrocitima) (β=-0,568, p=0,000). Model je statistički značajan (F=46,70, p=0,000) i objašnjava 32% varijanse zavisne promenljive (R²=0,323).

Analiziran je i uticaj vrednosti trombocita na DTU-AHG (sa trombocitima). Značajnost standardizovanog β koeficijenta pokazuje da uticaj postoji (β=-0,617, p=0,000), objašnjavajući 37% zavisne varijable (R²=0,375).

Utvrđeno je da vrednosti leukocita ne utiču na vrednost DTU-AHG (sa leukocitima) ($\beta=-0,119$, $p=0,237$). Prilagođeni R^2 pokazuje malu količinu objašnjene varijanse (1,4%).

Tabela 28. Povezanost citopenije i stepena utroška AHG-a nakon terapije

Zavisna varijabla	Nezavisna varijabla	Adjusted R ²	F(p)	β	<i>p</i>
Nakon primljene terapije: AHG(erc)	Erc	0,189	22,79(0,000)	-0,434	0,000
Nakon primljene terapije: AHG(erc)	Hgb	0,275	37,18(0,000)	-0,524	0,000
Nakon primljene terapije: AHG(erc)	Htc	0,298	41,63(0,000)	-0,546	0,000
Nakon primljene terapije: AHG(trc)	Trc	0,331	50,04(0,000)	-0,581	0,000
Nakon primljene terapije: AHG(leu)	Leu	0,017	25,6 (0,007)	-0,132	0,192

Sprovedena je jednostruka linearna regresija, kako bi se ocenio uticaj vrednosti eritrocita na DTU-AHG (sa eritrocitima). Model je statistički značajan ($F=22,79$, $p=0,000$). Vrednosti eritrocita utiču na DTU-AHG (sa eritrocitima) ($\beta=-0,434$, $p=0,000$), objašnjavajući 18% zavisne varijable ($R^2=0,189$).

Analiziran je uticaj koncentracije hemoglobina na DTU-AHG (sa eritrocitima). Značajnost standardizovanog β koeficijenta pokazuje da uticaj postoji ($\beta=-0,524$, $p=0,000$), objašnjavajući 27% zavisne varijable ($R^2=0,275$).

Vrednosti hematokrita takođe utiču na DTU-AHG (sa eritrocitima) ($\beta=-0,546$, $p=0,000$). Model je statistički značajan ($F=41,63$, $p=0,000$) i objašnjava 29% varijanse zavisne promenljive ($R^2=0,298$).

Ispitali smo da li vrednosti trombocita utiču na DTU-AHG (sa trombocitima). Značajnost standardizovanog β koeficijenta pokazuje da uticaj postoji ($\beta=-0,581$, $p=0,000$), objašnjavajući 33% zavisne varijable ($R^2=0,331$).

Vrednosti leukocita ne utiču na vrednost DTU-AHG (sa leukocitima) ($\beta=-0,132$, $p=0,192$) i prilagođeni R^2 pokazuje malu količinu objašnjene varijanse (1,7%).

Utvrđivanje da li razlika u titru direktnog testa utroška antihumanog globulina ima pozitivnu prediktivnu vrednost u odnosu na tok bolesti, odnosno da li je manja razlika u titru jedan od pokazatelja bolje prognoze bolesti zajedno sa porastom vrednosti ostalih praćenih parametara krvne slike prikazano je u Tabeli 29 i 30.

Tabela 29. Povezanost titra DTU-AHG sa eritrocitima, leukocitima, trombocitima, hemoglobinom i hematokritom pre terapije

		Pre primljene terapije: AHG(erc)	Pre primljene terapije: AHG(trc)	Pre primljene terapije: AHG(leu)
Pre primljene terapije: Erc	rho	<i>-0,671**</i>		
	p	<i>0,000</i>		
	N	100		
Pre primljene terapije: Trc	rho		<i>-0,856**</i>	
	p		<i>0,000</i>	
	N		100	
Pre primljene terapije: Leu	rho			<i>-0,403**</i>
	p			<i>0,000</i>
	N			100
Pre primljene terapije: Hgb	rho	<i>-0,749**</i>		
	p	<i>0,000</i>		
	N	100		
Pre primljene terapije: Htc	rho	<i>-0,717**</i>		
	p	<i>0,000</i>		
	N	100		

Vršeno je ispitivanje da li je manja razlika u titru DTU-AHG u statistički značajnoj korelaciji sa višim vrednostima krvne slike.

Spirmanovim koeficijentom korelacije ispitivana je povezanost DTU-AHG (erc, trc, leu) sa parametrima krvne slike. Rezultati istraživanja ukazuju na statistički značajnu povezanost između DTU-AHG (erc) i eritrocita ($\rho=-0,671$, $p=0,000$), hemoglobina ($\rho=-0,749$, $p=0,000$) i hematokrita ($\rho=-0,717$, $p=0,000$) (Tabela 29).

Drugim rečima, što su veće vrednosti eritrocita, hemoglobina i hematokrita to su vrednosti razlika u titru niže.

DTU-AHG (trc) je statistički značajno povezana sa trombocitima ($\rho=-0,854$, $p=0,000$) (Tabela 29). Što su veće vrednosti trombocita to su vrednosti razlika u titru niže.

Statistički značajna povezanost postoji između DTU-AHG(leu) i leukocita ($\rho=-0,378$, $p=0,000$) (Tabela 29). Drugim rečima, što su veće vrednosti leukocita to je razlika u titru niža.

Tabela 30. Povezanost titra AHG sa eritrocitima, leukocitima, trombocitima, hemoglobinom i hematokritom nakon terapije

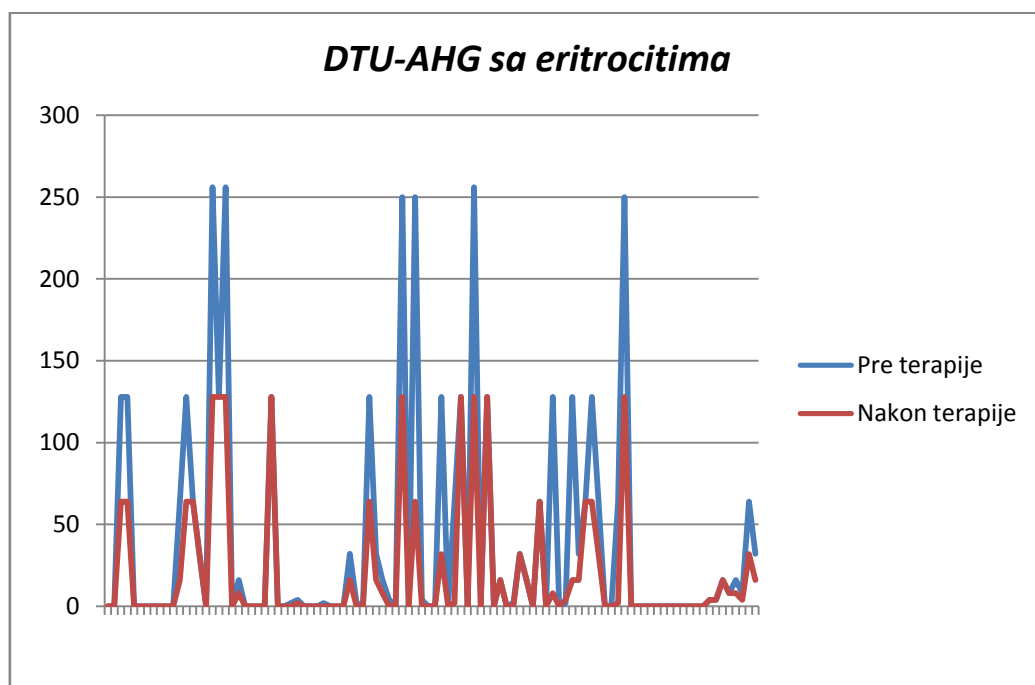
		Nakon primljene terapije: AHG(erc)	Nakon primljene terapije: AHG(trc)	Nakon primljene terapije: AHG(leu)
Nakon primljene terapije: Erc	rho	-0,597**		
	p	0,000		
	N	100		
Nakon primljene terapije: Trc	rho		-0,854**	
	p		0,000	
	N		100	
Nakon primljene terapije: Leu	rho			-0,378**
	p			0,000
	N			100
Nakon primljene terapije: Hgb	rho	-0,693**		
	p	0,000		
	N	100		
Nakon primljene terapije: Htc	rho	-0,743**		
	p	0,000		
	N	100		

Uočljiva je statistički značajna povezanost između DTU-AHG (erc) i eritrocita ($\rho=-0,597$, $p=0,000$), hemoglobina ($\rho=-0,693$, $p=0,000$) i hematokrita ($\rho=-0,743$, $p=0,000$) (Tabela 30). Dakle, što su više vrednosti eritrocita, hemoglobina i hematokrita to su vrednosti razlike u titru niže.

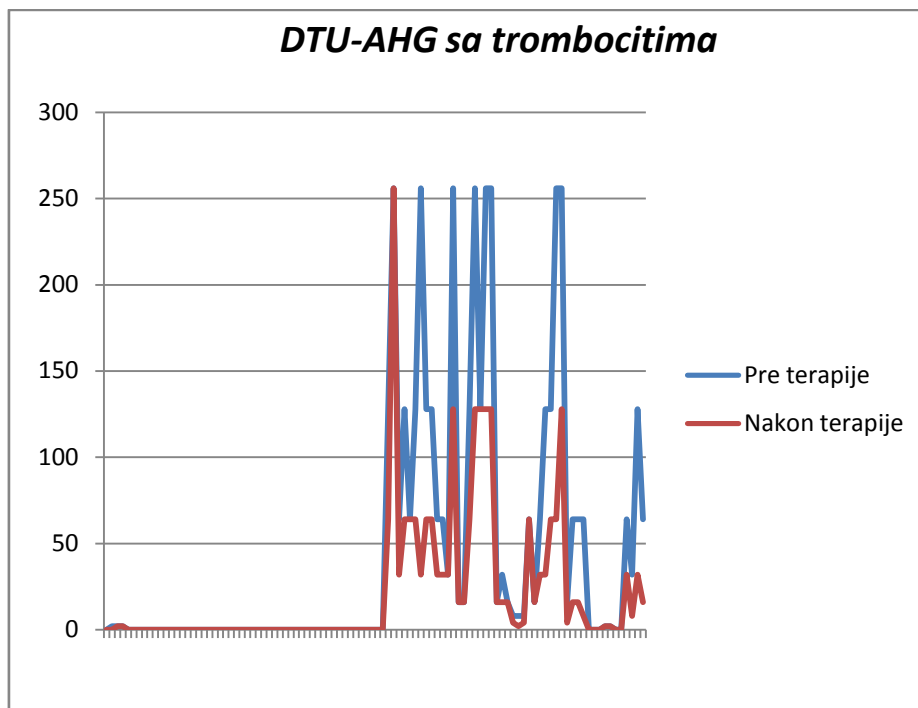
DTU-AHG(trc) je statistički značajno povezana sa trombocitima ($\rho=-0,854$, $p=0,000$) (Tabela 30). Dakle, što su više vrednosti trombocita to su vrednosti razlike u titru niže.

DTU-AHG(leu) je statistički značajno povezan sa leukocitima ($\rho=-0,378$, $p=0,000$) (Tabela 30). Dakle, što su više vrednosti leukocita, to su vrednosti razlike u titru niže.

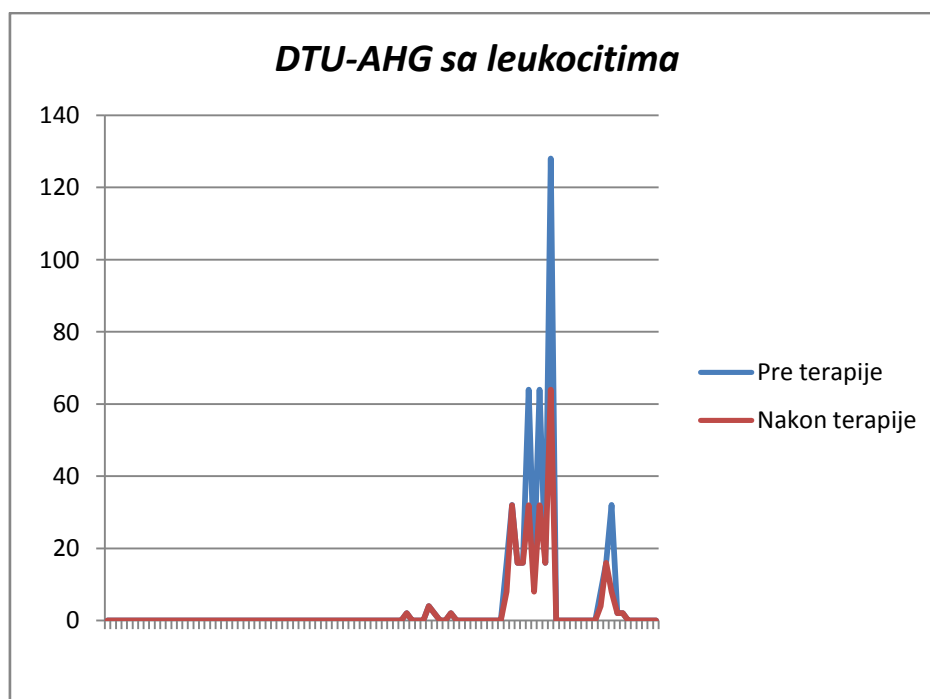
Razlike u titru na svim krvnim lozama pre i posle terapije prikazane su na Grafikonu 14, 15 i 16.



Grafikon 14. Razlike titra DTU-AHG sa eritrocitima pre i posle terapije



Grafikon 15 . Razlike titra DTU-AHG sa trombocitima pre i posle terapije



Na grafikonima 14, 15 i 16. se uočava da su razlike u titrovima manje nakon primljene terapije, što implicira da je količina vezanih antitela na eritrocitima, leukocitima i trombocitima nakon terapije manja i ukazuje da se DTU-AHG može upotrebiti u predikciji toka bolesti.

7. DISKUSIJA

Citopenija jedne ili više krvnih loza je čest laboratorijski nalaz kod ambulantnih i hospitalizovanih pacijenata. Može nastati kao posledica smanjene produkcije krvnih ćelija ili njihove pojačane destrukcije i gubitka. Uzrok smanjene produkcije krvnih ćelija može da bude rezultat poremećaja matične ćelije hematopoeze ili posledica sekundarnih faktora kao što su: deficit gvožđa, folata, vitamina B12, sistemske bolesti (bolesti jetre, bubrega, vezivnog tkiva), trudnoće, infekcije (HIV, hepatitis), supresije kostne srži dejstvom leka ili infiltracije kostne srži limfomima ili metastazama karcinoma.

Čest pratilac autoimunih oboljenja je citopenija iako nije u potpunosti razjašnjena njihova međusobna povezanost.

Pozitivan DAT nastaje kao posledica *in vivo* oblaganja eritrocita imunoglobulinima i komponentama komplementa. Vezivanje antitela i komponenti komplementa za eritrocitnu membranu samo po sebi ne znači i oštećenje eritrocita i skraćenje njihovog životnog veka te je za pravilnu interpretaciju pozitivnog DAT-a potrebno poznavati pacijentovu anamnezu, kliničke podatke i rezultate drugih laboratorijskih testiranja koji bi ukazivali na razvoj hemoliznog procesa (164,165).

Prag osetljivosti DAT-a za detektovanje vezanih antitela je za IgG molekule 250-500 IgG i 400-1000 C3d molekula po eritrocitu za metodu aglutinacije u epruveti, dok je tehnikom aglutinacije u gelu moguće detektovati svega 150 molekula globulina po eritrocitu (166). Izvođenje DAT-a metodom aglutinacije u gelu, omogućilo je detekciju IgG molekula u niskoj koncentraciji, što dovodi do povećanja broja pozitivnih rezultata DAT-a kod ispitanika. Istraživanje sprovedeno na 64 uzoraka dobrovoljnih davaoca krvi sa pozitivnim DAT-om pokazalo je slabiju osetljivost metode aglutinacije u gelu za otkrivanje eritrocita obloženih samo sa C3d komponentom komplementa u odnosu na metodu u epruveti (167). To je evidentirano i u studijama u kojima su kod 40–47% dobrovoljnih davalaca krvi sa pozitivnim DAT-om detektovane samo komponente komplementa (C3d). Neka istraživanja su ukazala na činjenicu da je

prisustvo ovih fragmenata na eritrocitima dokaz o kontinuiranoj aktivaciji sistema komplementa slabog inteziteta i da ne uključuje specifičnu reakciju antigen-antitelo. Zato se za njih kaže da su „nevino prisutni“ i prave smetnju u imunohematološkom testiranju (168).

Primena različitih tehnika u testiranju ali i kvalitet AHG test reagenasa mogu da u znatnoj meri utiču na rezultat DAT-a. Prag senzitivnosti nije precizno određen i varira među komercijalnim antiglobulinskim reagensima. Dokazano je da neki reagensi ne mogu da detektuju IgG u količini ispod 500 IgG molekula po eritrocitu, dok je u drugom istraživanju prikazano da je granica 150 IgG molekula po eritrocitu. Koncentracija antitela na eritrocitu manja od 150 IgG molekula je dovoljna da izazove hemolizu, što je i dokazano u istraživanju autoantitela koje je sproveo istraživači tim na čelu sa Gilliandom (169), kao i u studiji Mollison-a i Hugh-Jones-a koji su ispitivali aloantitela (170).

Primena DAT-a je izuzetno značajna u diferencijaciji hemoliza koje su nastale pod uplivom imunog mehanizma od hemoliza koje su prouzrokovane nekim drugim faktorom. Određeni broj pacijenata ima pozitivan DAT a da životni vek eritrocita nije skraćen: pozitivan DAT bez propratnih znakova hemolize javlja se kod 1:14 000 zdravih dobrovoljnih davalaca krvi i kod 1-15% hospitalizovanih pacijenata (171).

Smatra se da u takvim situacijama, kao posledica disregulacije imunog sistema ili generalizovanog inflamatornog stanja, dolazi do nespecifične adsorpcije antitela na eritrocitnu membranu. Ovi IgG molekuli nisu imunološki vezani za membranu i ne dovode do hemolize. Analizom eluata sa DAT pozitivnih eritrocita može se utvrditi da li su antitela imunološki ili nespecifično vezana za ćelije.

U drugoj studiji koja je obuhvatila zdrave dobrovoljne davaoce krvi bez znakova anemije, prikazana je učestalost pozitivnog DAT-a od 1 na 10 000. Ako se izuzme hemoliza kao uzrok pozitivnog DAT-a, dokazano je da antifosfolipidna antitela mogu uticati na rezultat pozitivnog DAT-a. Takođe citofilična ili nespecifična IgG antitela adsorbovana iz plazme mogu biti uzrok pozitivnog DAT-a (172).

Smatra se da bi između 1% i 3.5% nasumično odabranih hospitalizovanih pacijenata imalo pozitivan DAT koji ne mora biti povezan sa hemolizom. Zapaženo je da se incidenca pozitivnog DAT-a značajno povećava kod pacijenata sa hemoliznom transfuzijskom reakcijom, autoimunim oboljenjima, urođenim i stečenim imunodeficijntnim sindromima i malignitetima. Sprovedena studija u Americi pokazala je da je prevalenca pacijenata sa pozitivnim DAT-om 65,8% a izrazito pozitivan DAT se javljao kod pacijenata sa autoimunim oboljenjima i kod onih koji su primili transfuziju krvi u poslednja tri meseca (173).

Mnogi farmakološki agensi su povezani sa pozitivnim rezultatom DAT-a sa ili bez znakova hemolizne anemije. Određeni lekovi se vezuju za membranu cirkulišućih ćelija uzrokujući stvaranje antitela koja mogu da budu usmerena ka leku i određenoj membranskoj komponenti ili ka epitopima molekule leka koja je čvrsto vezana za eritrocitnu membranu. Hemolizna anemija koja nastaje kao posledica lekova (penicilin i drugi antibiotici) se brzo povlači kada se uzročnik odstrani iz cirkulacije. Neki drugi medikamenti (npr. α -metildopa) izazivaju nastanak hemolizne anemije koja se ne povlači ni kad se oni odstrane iz cirkulacije. Smatra se da indukuju produkciju antieritrocitnih antitela koja ne zahtevaju prisustvo leka da bi se vezali za eritrocite (174).

Ako je pacijent primio transfuziju u poslednja tri meseca, pozitivan DAT može biti posledica aloimunizacije na antigen transfundovanih eritrocita. Ono se javlja 7-10 dana nakon transfuzije ili i ranije ako je pacijent već bio izložen tom antigenu prilikom prethodnih transfuzija (175).

Ređi uzročnik pozitivnog DAT-a može biti skorašnja primena intravenoznog imunog globulina koji može da sadrži antitela protiv ABO, Rh i drugih eritrocitnih antigena. Titar ovih pasivno prenesenih antitela nestaje tokom vremena pa će vremenom i DAT postati negativan. Kod pacijenata koji su podvrgnuti transplantaciji matičnih ćelija hematopoeze ili organa, limfociti donora mogu proizvoditi antitela specifična na eritrocitne antigene primaoca. U ovim slučajevima stepen himerizma između limfocita koji proizvode antitela i primaoca diktiraće koliko dugo će rezultat DAT-a biti pozitivan (176).

Iako ne postoji savršena korelacija između jačine antiglobulinske reakcije i jačine hemolize, ovaj odnos je u funkciji prirode antitela. Još 1955. godine Evans je koristeći serijska razblaženja AHG dokazao da se kod većine pacijenata smanjuje jačina reakcije u skladu sa poboljšanjem ili potpunom remisijom hemolizne bolesti. Međutim deševalo se da test u visokoj razlici u titru ostane pozitivan i nepromenjen čak i kada su se znaci hemolize snižavali (177). Ovi nalazi govore u prilog postojanju i drugih faktora koji utiču na hemolitičku potentnost antitela kao što su IgG subklasa, prostorna orijentacija IgG molekula na površini eritrocita ili brzina uklanjanja senzitivisanih eritrocita in vivo. Kao posledica toga, pacijenti koji su u remisiji hemolizne anemije mogu imati pozitivan DAT.

Napori da se standardizuju antiglobulin reagensi, njihova primena i interpretacija reakcije aglutinacije traju više od 50 godina. Chaplin je detaljno opisao tehničke probleme koji mogu dovesti do lažno pozitivnog ili lažno negativnog DAT-a (178).

Tri uzroka koja mogu dovesti do negativnog DAT-a a da je prisutna hemoliza su:

- a) senzitivizacija eritrocita sa IgG antitelima ispod praga detekcije
- b) nizak afinitet IgG antitela na senzitivisane eritrocite pri čemu dolazi do njihovog gubitka prilikom pripremnog pranja eritrocita neposredno pre izvođenja DAT-a
- c) senzitivizacija sa IgA antitelima, koja ponekad pokazuju specifičnost ka Rh antigenu, ili retko, monomerno IgM antitelo bez fiksacije komplementa, koje mnogi komercijalni DAT reagensi ne mogu identifikovati jer sadrže isključivo anti-IgG i anti-C3.

Nekoliko različitih testiranja je sprovedeno da bi potvrdilo prisustvo senzitivisanih eritrocita antitelima u slučajevima gde se sumnjalo na prisustvo hemolize a pri kojima je DAT davao negativan rezultat.

Konzumacioni test je bio prvi koji je kvantifikovao IgG molekule adsorbovane na eritrocite i utvrdio da i mala količina IgG antitela može izazvati hemolizu. Prilikom jednog istraživanja 27 pacijenata sa negativnim DAT-om a znacima hemolize je testirano konzumacionim testom i kod svih su nalazi bili pozitivni. U toj laboratoriji je

dokazano da se na eritrocitima nalazi IgG u količini manjoj od 25 molekula IgG po eritrocitu i primenom direktnog testa utroška AHG-a uspešno je detektovana i tako niska koncentracija antitela (179-182).

Niska koncentracija IgG antitela na senzitisanim eritrocitima se ređe javlja kao uzrok negativnog DAT-a kod pacijenata sa znacima hemolize, međutim dokazana je povezanost sa ozbiljnim hemolizama. Razlog je u tome što se ova antitela mogu ukloniti prilikom pranja eritrocita na 37 °C ili na sobnoj temperaturi. Ovaj problem se može preduprediti pranjem eritrocita hladnim fiziološkim rastvorom, čime se sprečava gubitak IgG antitela i omogućava dobijanje pozitivnog nalaza DAT-a. Prilikom jednog istraživanja od ukupnog broja testiranih uzoraka, IgG antitela sa niskim afinitetom su detektovana u 4,9% slučajeva (183). Upotrebom floucitometrije mogu se detektovati IgG antitela sa slabim afinitetom i samim time smanjiti učestalost lažno negativnog DAT-a.

Kao treći uzrok negativnog DAT-a kod pacijenata sa prisutnom hemolizom je senzitivizacija sa IgA antitelom ili vrlo retko monomernim IgM antitelom male molekulske težine koje ne vezuje komplement. Većina komercijalnih DAT reagenasa sadrži samo anti-IgG ili anti-C3 komponente i samim tim ne mogu da detektuju neuobičajeno IgA antitelo. IgA i IgM antitelo mogu udruženo sa IgG i C3 komponentom učestvovati u nastanku hemolize ali u tim slučajevima pozitivan DAT je posledica detekcije IgG antitela i C3 komponente (184).

Međutim u slučajevima kada je samo IgM izazvalo hemolizu bez prisustva C3 komponente, rezultiralo je negativnim DAT-om. Istraživanje na 49 pacijenata sa hemoliznom anemijom, dokazalo je da je kod 3 pacijenata uzrok hemolize IgM antitelo prisutno na eritrocitima (185). U drugim ispitivanjima otkriveno je da 15-20% hemoliznih anemija nastaje kao posledica senzitivizacije eritrocita kombinacijom IgG i IgA antitela (186).

Pojedini slučajevi hemoliza nastalih pod uticajem IgA antitela uključuju aktiviranje komplementa alternativnim putem i pretpostavlja se da se takav eritrocit obložen komplementom vezuje za receptore mononuklearnog fagocita. IgA antitelo

reaguje direktno sa Fc receptorima mononuklearnih fagocita i pretpostavlja se da citotoksični limfociti igraju ulogu medijatora u nastanku hemolize (187).

Ispitivanjem u okviru ove teze je bilo obuhvaćeno ukupno 100 uzoraka pacijenata oba pola, sa dijagnostikovanom anemijom, limfoproliferativnim oboljenjem, miastenijom gravis, MDS-om, sistemskim lupusom, trombocitopenijom, trombotičnom trombocitopeničnom purpurom (TTP) i idiopatskom trombocitopeničnom purpurom (ITP).

Kontrolnu grupu je činilo 20 zdravih osoba (nasumično odabranih dobrovoljnih davalaca krvi), kod kojih nije dijagnostikovano hematološko ili autoimuno oboljenje.

Od 100 ispitivanih pacijenata 52 je imalo dijagnozu anemije, 20 limfoproliferativnog oboljenja, 9 mijelodisplastičnog sindroma, 8 trombocitopenije, 3 leukopenije i po dva pacijenta sa TTP, ITP, sistemskim lupusom i miastenijom gravis.

Približno 22% ispitanika su činile osobe muškog pola. Pacijenti stariji od 50 godina čine 76% ispitanika.

Najveći broj ispitanika koji su podvrgnuti ispitivanju bio je sa dijagnozom anemije. Uzimajući u obzir da je prema istraživanju Svetske zdravstvene organizacije koje je sprovedeno u Srbiji 2000.godine procenjeno da je prevalenca anemije među zdravom populacijom 29,5%, ovako visok procenat zastupljenosti anemije među ispitanicima ne iznenađuje, obzirom da se anemija često javlja i kao prateća pojava mnogih drugih oboljenja. Anemija predstavlja važan uzrok morbiditeta i mortaliteta i smatra se da prevalenca niskih vrednosti hemoglobina u populaciji preko 5%, mora da se tretira kao problem od značaja za javno zdravlje. Svetska zdravstvena organizacija je na osnovu vrednosti koncentracije hemoglobina odredila kriterijume za određivanje značaja anemije po javno zdravlje populacije (188).

Ako je prevalenca niskih vrednosti hemoglobina u opštoj populaciji:

- 5-19,9% - niska značajnost
- 20-39,9% - umerena značajnost
- $\geq 40\%$ - visoka značajnost

Među ispitanicima sa dijagnozom anemije, većina ili 84,6% je bilo ispitanika ženskog pola, obzirom da osobe ženskog pola imaju više faktora rizika za nastanak anemije u odnosu na mušku populaciju.

Prosečan nivo hemoglobina ispitanika je iznosio 89,85 g/l. Anemija je takođe bila prisutna kod svih ispitivanih pacijenata sa dijagnozom neke od limfoproliferativnih bolesti, mijelodisplastičnog sindroma, miastenije gravis, sistemskog lupusa, TTP-a i ITP-a.

Iz uzoraka svih pacijenata rađen je direktni antiglobulinski test (DAT) i direktni test utroška antihumanog globulina (DTU-AHG) pre i nakon primljene terapije.

Primenom direktnog antiglobulinskog testa može se utvrditi prisustvo antitela vezanih za eritrocitnu membranu, dok se upotrebom testa utroška antihumanog globulina može utvrditi prisustvo antitela ne samo na eritrocitima već i na površini leukocita i trombocita.

Od 52 pacijenta sa dijagnozom anemije, kod njih 11 DAT je pokazao pozitivnost a DTU-AHG na eritrocitima kod 24. Svih 11 pacijenata sa pozitivnim DAT-om imalo je pozitivan test DTU-AHG-a i to u visokoj razlici titra sa eritrocitima bolesnika u odnosu na zdrave osobe. Prema dobijenim rezultatima DAT i DTU-AHG, uočava se da je putem primene DTU-AHG detektovana za 25% veća prisutnost antitela na eritrocitima pacijenata u odnosu na detekciju putem DAT-a.

U ispitivanom uzorku svih 11 anemičnih pacijenata sa pozitivnim DAT-om imalo je i pozitivan direktni test utroška AHG-a (DTU- AHG) i to sa detektovanim razlikama u titru. Nakon primljene terapije njihov broj je i dalje ostao isti sa pozitivnim DAT-om.

Wilcoxon-ovim Z testom dokazano je da se vrednosti DTU-AHG statistički značajno razlikuju pre i nakon terapije ($Z=-5,17$, $p=0,000$). Veće vrednosti razlika u titrovima u DTU-AHG su pre nego nakon terapije.

Vrednosti eritrocita i hemoglobina pokazuju veću vrednost nakon terapije dok su vrednosti hematokrita približne, mada je uočena razlika statistički značajna prilikom analiziranja celog uzorka ($Z=-5,31$, $p=0,000$) (Tabela 25 , Grafikon 4).

Kod ove grupe pacijenata DTU-AHG sa trombocitima detektovao je malu razliku u titrovima antitela u vrednosti od 2 kod 3 pacijenta i ta razlika u titrovima je ostala prisutna i prilikom drugog testiranja. Verovatno je da se radi o neimunim antitelima koja su prisutna na površini ćelijskih elemenata koja ne izazivaju njihovo oštećenje.

DTU-AHG sa leukocitima nije pokazao razlike u titrovima u pacijenata u odnosu na kontrolne leukocite te time nije detektovao prisustvo antitela ni pre ni posle primljene terapije.

Grupu limfoproliferativnih oboljenja čine: hronična limfocitna leukemija (HLL), Hodgkinov limfom (Hodgkinovabolest) i non-Hodgkin limfomi. Karakteriše ih poremećaj imuniteta a najčešća autoimuna pojava je pojava antieritrocitnih antitela koja se mogu otkriti direktnim antihumanim globulinskim testom kao i direktnim testom utroška antihumanog globulina.

Kod 20 pacijenata sa limfoproliferativnim oboljenjima, na početku ispitivanja kod 7 DAT je bio pozitivan dok je DTU- AHG-a bio pozitivan kod njih 13. Nakon primljene terapije pozitivnost DAT-a je nestala kod dva pacijenta dok je DTU-AHG pokazao razlike u titrovima pacijenata i zdravih osoba i time detektovao antitela kod 11 pacijenata. DTU-AHG je pokazao razlike u titru od 2 i na uzorcima dva pacijenta kojima je DAT bio negativan. Moguće objašnjenje je u relativno niskom pragu osetljivosti DAT na koncentraciju IgG na eritrocitima (Grafikon 5).

Mogućnost nastanka autoimune anemije predstavlja najvažniju komplikaciju limfoproliferativnih bolesti. Autoimune hemolizne anemije se javljaju kad dođe do nastanka antitela koja se vežu za eritrocite i dovode do njihove destrukcije. Topla antitela su IgG klase, mogu i ne moraju da vežu komplement i primarno dovode do gubitka eritrocita koji se odstranjuju u slezini. Istraživanja su pokazala da se javlja kao komplikacija u preko 50% slučajeva kod limfoproliferativnih bolesti (189).

Mnoga istraživanja su ukazala na značaj praćenja znakova anemije kod pacijenata sa ovom dijagnozom, jer je nastanak hemolizne anemije povezan sa lošijom prognozom bolesti (190).

U nekoliko kliničkih studija koja su sprovedena, uzorci pacijenata sa limfoproliferativnim oboljenjima pokazivala su pozitivnost DTU-AHG u 65% slučajeva sa eritrocitima, 70% sa leukocitima i 15% sa trombocitima. DAT je bio pozitivan u oko 50% uzoraka što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju (191).

Rezultati mnogih istraživanja ukazuju da je pojava pozitivnog DAT-a u bilo kom stadijumu bolesti povezana sa lošom prognozom bolesti (192).

Prilikom izvođenja DTU-AHG sa trombocitima, kod 14 pacijenata primetna je prisutnost antitela i pre i nakon primljene terapije.

Obzirom da je kod ovih pacijenata prisutna visoka vrednost leukocita, DTU-AHG je i pre i nakon terapije pokazao prisutnost veoma male razlike u titru antitela kod 4 pacijenta na leukocitima. Verovatno da ova antitela ne utiču na razaranje leukocita obzirom da su visoke vrednosti leukocita perzistirale prilikom testiranja uzoraka pacijenata tokom ispitivanja (Grafikon 6 i 7.)

Mijelodisplazni sindromi (MDS) su heterogena grupa klonskih poremećaja matične ćelije hematopoeze koji karakteriše neefektivna hematopoeza, displazija jedne ili više ćelijskih loza u kostnoj srži, citopenija u perifernoj krvi i povećan rizik od razvoja akutne leukemije. Rhoads i Barker su 1938. godine opisali 100 bolesnika čija se anemija nije mogla korigovati lečenjem hematinicima i nazvali je „refrakтерна anemija“, a kasnije je uočeno da ona može prethoditi nastanku akutne leukemije.

Sindrom je opisivao različitim nazivima: preleukemija, preleukemijska humana leukemija, oligoblastna leukemija, „tinjajuća“ leukemija i sl, a naziv „mijelodisplazni sindrom“ predložila je 1982.godine FAB kooperativna grupa (193). Klonsko poreklo bolesti je postalo izvesno nalazom „ponavljanih“ kariotipskih anomalija u ćelijama kostne srži bolesnika sa MDS-om ali su prvi neposredni dokaz klonalnosti dali Prchal i saradnici našavši jedan tip izoenzima glukoza-6-dehidrogenaze u ćelijama eritrocitne,

granulocitne i megakariocitne loze, B- i T-limfocitima bolesnice heterozigotne za ovaj enzim(194).

Prilikom postavljanja dijagnoze kod pacijenata za koje se sumnja da su sa dijagnozom MDS-a karakterističan je nalaz sporo progredirajućih citopenija rezistentnih na hematinike uz postojanje displastične hematopoeze u najmanje jednoj ćelijskoj liniji. Da bi se potvrdila dijagnoza neophodno je da bude zasnovana na kliničkim i laboratorijskim nalazima, morfološkoj analizi ćelija krvi i kostne srži, patohistološkoj analizi tkiva kostne srži i citogenetskoj analizi.

Na početku ispitivanja od 9 pacijenata sa MDS-om kod dva je DAT bio pozitivan dok je DTU-AHG-a bio pozitivan kod 6. Nakon primljene terapije pozitivnost DAT-a se nije menjala kao ni DTU-AHG koji je detektovao antitela kod istog broja pacijenata. Vrednosti razlike u titrovima DTU-AHG kod pacijenata koji imaju i pozitivan DAT je 128 i 256 da bi se pri narednom testiranju razlika u titru smanjila na 64 i 128 pri čemu je došlo do promena u vrednostima eritrocita, trombocita i leukocita (Grafikon 8 i 9).

Posmatrajući pacijente kojima je DAT bio negativan a DTU-AHG pozitivan, uočava se da se razlika u titru kreće u intervalu od 32 do 64 sa tendencijom opadanja prilikom narednog testiranja pogotovo u slučajevima gde je došlo do rasta vrednosti eritrocita, hemoglobina i hematokrita.

Wilcoxon-ovim Z testom dokazano da se vrednosti DTU-AHG statistički značajno razlikuju pre i nakon terapije ($Z=-5,17$, $p=0,000$) pri čemu se veća razlika u titru DTU AHG uočava pre nego nakon terapije.

Prilikom izvođenja DTU-AHG sa trombocitima, kod 5 pacijenata primetna je prisutnost antitela i pre i nakon primljene terapije. Razlika u titru se kreće od 8 do 32. Obzirom da su svi pacijenti imali niske vrednosti leukocita, DTU-AHG je pokazao prisutnost razlike u titru kod 6 pacijenta i antitela na leukocitima a kod 5 je došlo do smanjena razlike u titru prilikom ponovnog testiranja.

Trombocitopenije su stanja koja se karakterišu manjim brojem trombocita od 150×10^9 u perifernoj krvi. Povezane su sa većim rizikom od krvarenja a mogu nastati kao posledica smanjenog stvaranja trombocita, povećane razgradnje, poremećene

distribucije trombocita kao i kombinacijom pomenutih mehanizama. Trombocitopenije mogu biti nasledni i stečeni poremećaji.

U slučaju primene transfuzijskog lečenja česta je rana aloimunizacija pacijenta i refrakternost na transfuzije trombocita(195).

Anti-trombocitna antitela reaguju sa brojnim membranskim strukturama na površini trombocita i najčešće su klase IgG i IgM. Nastaju imunizacijom prilikom transfuzije trombocita, trudnoće i trasnplantacije i dovode do destrukcije trombocita i posledične trombocitopenije (130, 196-198).

Ni jedan od 8 pacijenata sa trombocitopenijom nije imao pozitivan ni DAT ni DTU-AHG sa eritrocitima tokom celokupnog ispitivanja.

Razlika u titru antitela DTU-AHG sa trombocitima postoji kod 5 pacijenata i vrednosti razlike u titru se kreću od 16 do 256 dok se vrednosti trombocita kreću od 44 do 87 (Grafikon 10.)

Nakon primljene terapije, uočen je porast vrednosti trombocita dok se razlika u titru smanjila minimalno, za jedno razređenje.

TTP je klinički sindrom koji se odlikuje stvaranjem diseminovanih okluzivnih trombocitnih agregata u terminalnim arteriolama i kapilarima. Bolest se ispoljava u vidu trombocitopenije i intravaskularne mikroangiopatske hemolizne anemije usled fragmentacije eritrocita pri prolasku kroz začepljene sitne krvne sudove organizma. Okluzija dovodi do tkivne hipoksije i posledične disfunkcije organa, posebno centralnog nervnog sistema, gastrointestinalnog trakta i bubrega (199).

U odsustvu pouzdanog standardizovanog testa, dijagnoza TTP-a se za sada, zasniva na kliničkoj slici. Jedna od neophodnih laboratorijskih analiza dijagnostici TTP-a je i određivanje DAT-a.(200).

Kod dva pacijenta koja su ispitivana u okviru ovog istraživanja broj trombocita je prilikom prvog testiranja iznosio $8 \text{ i } 24 \times 10^9/\text{l}$ da bi prilikom narednog iznosio $25 \text{ i } 45 \times 10^9/\text{l}$ Kod dva pacijenta koja su testirana i DAT je bio negativan tokom celog ispitivanja dok je DTU- AHG prikazao prisutnost antitela u niskom titru sa eritrocitima

a u nešto višem titru sa trombocitima. Tokom narednog testiranja došlo je do pada razlike u titru za jedno razblaženje. DTU-AHG nije pokazao razliku u titru sa leukocitima pacijenta u odnosu na zdrave i nije detektovao antitela na leukocitima.

Idiopatska trombocitopenična purpura je automimuna bolest u kojoj destrukcija trombocita nastaje pod dejstvom primarnih antitrombocitnih antitela protiv trombocitnih GPIIb/IIIa, GPIb/IX i drugih. Odlikuje se normalnim ili povećanim brojem megakariocita u kostnoj srži, odsustvom splenomegalije i drugih bolesti. Po toku može biti akutna i hronična.

Harrington je prvi dokazao da su trombociti uništeni dejstvom humornog faktora prisutnog u plazmi ITP pacijenata (201). Ubrizgavanjem sopstvene plazme u krvotok pacijenta sa aktivnim ITP-om, ubrzo je zabeležio nastanak ozbiljne trombocitopenije i purpure. Nakon nekoliko dana kada je došlo do oporavka, demonstrirana je destrukcija trombocita i njihov oporavak na zdravim ispitanicima koji su dobrovoljno učestvovali u ispitivanju. Schulman je nakon toga dokazao da je humoralni faktor koji je bitan u ovoj reakciji IgG frakcija plazme (202).

U priručniku za ITP Američke Asocijacije za Hematologiju tvrdi se da su serološka testiranja nepotrebna u dijagnostici ITP jer se smatra da su klinički nalazi dovoljni za postavljanje dijagnoze bolesti, određivanje antitela može biti od velike koristi ako postoji sumnja na ITP, pri čemu je i druge neimune uzroke trombocitopenije neophodno razmatrati u diferencijalnoj dijagnozi. Cilj serološkog testiranja u ITP je detektovanje antitela koja su vezana za pacijentove trombocite sa ili bez demonstracije slične reaktivnosti u pacijentovoj plazmi (203). U literaturi postoji podatak da je pozitivnost DTU-AHG zabeležena kod 50% ispitanika (204).

Prilikom ispitivanja u ovoj studiji cilj nije bio dokazivanje prisustva antitela u cilju postavljanja dijagnoze jer ispitivanje ni nije sprovedeno serološkim tehnikama detekcije antitrombocitnih antitela. Suština ispitivanja se sastojala u ispitivanju da li se antitela na trombocitima mogu dokazati DTU-AHG i praćenje da li je dolazilo do promene razlike u titrovima u odnosu na zdrave osobe tokom nekog vremenskog perioda koji su pacijenti proveli na terapiji. Dva pacijenta sa ITP su obuhvaćena ovim testiranjem i oba su imala detektovana antitela na trombocitima sa razlikom u titru od 64

prilikom prvog testiranja. Tokom drugog testiranja razlika u titru se smanjila za jedno razblaženje. DAT i DTU-AHG sa eritrocitima i leukocitima pacijenata bio je i ostao negativan tokom celog ispitivanja.

Kod pacijenata sa ITP, DTU-AHG je pokazalo prisutnost razlike u titru u reakciji sa trombocitima. Terapija nije uticala na rezultat testa u ovom istraživanju.

DTU-AHG sa leukocitima je takođe bio negativan tokom ispitivanja ali su i vrednosti leukocita bile u okvirima normalnih vrednosti.

U kliničkoj studiji koju je sproveo Dausset u univerzitetškoj bolnici u Parizu pozitivna korelacija je utvrđena između pozitivnog i negativnog rezultata DTU-AHG sa prisustvom ili odsustvom citopenije u odgovarajućim ćelijskim serijama. Od ukupno 25 trombocitopeničnih pacijenata 55% je imalo pozitivan DTU-AHG rezultat sa trombocitima a kod leukopeničnih pacijenata je dao pozitivnost u 61% slučajeva (205).

Od tri pacijenta sa leukopenijom DAT i DTU-AHG su bili negativni tokom ispitivanja i sa ćelijama crvene krvne loze i trombocitima. Sva tri pacijenta su imala prisutnu razliku u titru DTU-AHG u rasponu od 8 do 32. Prilikom narednog testiranja kod dva pacijenta je došlo do pada razlike u titru, dok je kod jednog pacijenta ostala identična obzirom da se vrednosti leukocita nisu značajno promenile.

Antitela na leukocite su najčešće antigranulocitna antitela koja dovode do neutropenije a samim tim i leukopenije. Nastaju nakon transfuzija krvi i krvnih produkata i mogu biti auto i aloantitela.

U sprovedenoj studiji kod pacijenata sa dijagnozom leukopenije i trombocitopenije, u oko 50% slučajeva bio je prisutan pozitivan DTU-AHG. Upotreba indirektnog testa utroška antihumanog globulina daje mogućnost razlučivanja da li su u pitanju antitrombocitna ili antileukocitna antitela (206).

Miastenia gravis je autoimuna bolest. Nastaje kao posledica delovanja autoantitela na acetilholinske receptore na postsinaptičkoj mišićnoj membrani. Posledica delovanja je oslabljen učinak acetil-holina potrebnog za izazivanje mišićnog akcionog potencijala.

Kod pacijenata u okviru ovog istraživanja, DAT je bio negativan tokom celokupnog ispitivanja. DTU-AHG sa eritrocitima i trombocitima je detektovao prisutna antitela, dok na leukocitima nije. Razlika u titru antitela nije se menjala ni prilikom narednog testiranja iako je došlo do minimalnih promena vrednosti parametara krvne slike.

Podaci iz literature pokazuju da prisustvo antitela može biti posledica autoimunog procesa i da ona ne moraju biti obavezno klinički značajna, odnosno da dovedu do hemolize, pri čemu je neophodno kontinuirano praćenje pacijenata i laboratorijskih vrednosti (207).

Sistemska eritemski lupus je sistemsko oboljenje koje se odlikuje brojnim imunološkim poremećajima, dok se klinički može ispoljiti u vidu promena na koži, zglobovima, centralnom nervnom sistem i bubrežima. Glavni antigeni za autoantitela su nukleozomi (DNK-histoni), mali nuklearni i citoplazmatski ribonukleoproteini, kao i fosfolipidi ćelijskih membrana. Bolesnici uglavnom imaju antitela vezana za dvolančanu DNK, Smithov antigen i komponentu komplementa C1q.

Kod pacijenata u okviru ovog istraživanja, DAT je bio negativan tokom celokupnog ispitivanja. DTU-AHG sa eritrocitima, trombocitima i leukocitima je detektovao antitela, sa malom razlikom u titru koja je ostala nepromenjena i prilikom narednog testiranja.

Pri ispitivanju uzoraka pacijenata sa sistemskim lupusom DTU-AHG test na eritrocitima, leukocitima i trombocitima je u svim slučajevima bio pozitivan. Pozitivnost DTU-AHG testa posledica je prisustva antitela. Prisutna antitela na eritrocitima, leukocitima i trombocitima moguće da su nastala kao posledica trudnoća ili transfuzija krvi ili transplantacija kože ili organa. Rezultati sprovedenih istraživanja u okviru ove studije su potvrdila senzitivnost konzumacionog testa koja je uporediva sa senzitivnošću LE– Lupus erythematosus cell testa (208).

Poređenjem rezultata testiranja direktnog testa utroška antihumanog globulina i direktnog antiglobulin testa kod pacijenata pre i posle primljene terapije i na osnovu

dobijenih rezultata utvrđivano je da li je osetljiviji test utroška antihumanog globulina ili direktni antiglobulin test.

Vrednosti DTU-AHG sa eritrocitima ($Z=-5,17$, $p=0,000$), leukocitima ($Z=-2,37$, $p=0,018$) i trombocitima ($Z=-4,94$, $p=0,000$) statistički se značajno razlikuju pre i nakon terapije pri čemu je veća vrednost pre nego nakon terapije (Tabela 29).

Među ispitivanim pacijentima pre primljene terapije DAT je bio pozitivan u 20% slučajeva dok je DTU-AHG bio u 51%, što znači da je u 31% slučajeva bila veća mogućnost detekcije prisutnih antitela na eritrocitima. Nakon primljene terapije DAT je ostao pozitivan u 18% slučajeva a DTU- AHG u 46% što je što znači da je u 28% slučajeva bila veća mogućnost detekcije prisutnih antitela na eritrocitima (Grafikon 11).

Utvrđivanjem povezanosti između citopenije i stepena utroška antihumanog globulina dokazano je da svi praćeni parametri utiču na stepen utroška AHG: hemoglobin ($\beta=-0,579$, $p=0,000$), hematokrit ($\beta=-0,568$, $p=0,000$), eritrociti ($\beta=-0,519$, $p=0,000$), trombociti ($\beta=-0,617$, $p=0,000$) i leukociti ($\beta=-0,119$, $p=0,237$) (Tabela 27 i 28).

Takođe je dokazano da što su vrednosti posmatranih hematoloških parametara veće, razlika u titru direktnog testa utroška AHG-a je manja, što ide u prilog činjenici da je direktni test utroška AHG senzitivniji test koji može da ukaže na dinamiku bolesti a da je razlika u titrovima detektovana primenom DTU-AHG pozitivan prediktor toka bolesti posmatranog oboljenja.

Direktni test utroška AHG-a ukazuje na prisustvo antitela vezanih za eritrocite, leukocite i trombocite pacijenta koja mogu dovesti do posledične citopenije. DAT i direktni test utroška AHG smatraju se značajnim testovima kako u dijagnostici tako i prognozi mnogih bolesti, a nezaobilazni su i kao efikasno i pouzdano sredstvo monitoringa daljeg toka bolesti. Prisustvo antieritrocitnih antitela i hematološke posledice njihovog prisustva, često koreliraju sa stadijumom bolesti, drugim prognostičkim činiocima i ishodom terapije.

Predmet istraživanja predstavljao je primenu senzitivnog i efikasnog direktnog testa utroška antihumanog globulina sa ciljem ispitivanja prisustva vezanih antitela na krvnim ćelijama kod mnogih hematoloških i imunoloških poremećaja.

U rutinskoj transfuziološkoj upotrebi su metode detekcije prisustva antitela u serumu bolesnika ili pak metode kojima se detektuju antitela vezana na eritrocitima bolesnika, pri čemu nije moguća detekcija antitela vezanih za ostale krvne ćelije: trombocite i leukocite. Primena testa koji daje mogućnost detekcije vezanih antitela na svim krvnim ćelijama kod bolesnika predstavlja efikasan način da se stekne kompletan uvid u imunološka zbivanja, prati dinamika razvoja antitela i prognoza bolesti. Svrha ovog ispitivanja je primena direktnog testa utroška antihumanog globulina u dijagnostici i praćenju vezivanja antitela na trombocitima i leukocitima bolesnika kod mnogih hematoloških i imunoloških bolesti kao i razvoj i primena ove efikasne i reproducibilne tehnike u rutinskom transfuziološkom radu.

8. ZAKLJUČAK

Na osnovu postavljenih ciljeva ispitivanja direktnog testa utroška antihumanog globulina, a u skladu sa postavljenim hipotezama može se zaključiti:

1. Poređenjem rezultata testiranja direktnog testa utroška antihumanog globulina i direktnog antiglobulinskog testa kod pacijenata pre i posle primljene terapije utvrdili smo da je direktni test utroška antihumanog globulina značajno osjetljiviji test u odnosu na direktni antihumani globulinski test.

2. Upoređivanjem stepena citopenije i konzumacije antihumanog globulina utvrdili smo da postoji pozitivna korelacija između citopenije i stepena konzumacije antihumanog globulina.

3. Manja razlika u titru direktnog testa utroška antihumanog globulina sa ćelijama bolesnika u odnosu na zdrave ima pozitivnu prediktivnu vrednost na tok bolesti.

9. LITERATURA

1. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819-26.
2. Holtmeier W, Kabelitz D. Gammadelta T cell links innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy* 2005;86:151-83.
3. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Function of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008;9:503-10.
4. Karasuyama H, Mukai K, Tsujimura Y, Obata K. Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. *Nat Rev Immunol* 2009;9:9-13.
5. Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010;10:301-16.
6. Jeannin P, Jaillon S, Delneste Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr Opin Immunol* 2008;20:530-37.
7. Beetz S, Wrsch D, Marischen L, Welte S, Oberg HH, Kabelitz D. Innate immune functions of human gamma-delta T cells. *Immunobiology* 2008;213:173-82.
8. Krangel MS. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol* 2009;21:133-39.
9. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochem Biophys Acta* 2002;1589:1-13.
10. Gonzales S, Lopez-Soto A, Suarez-Alvarez B, Lopez-Vasquez A, Lopez-Larrea C. NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol* 2008;29:397-403.
11. Jovanovic Srzentic S, Veljkovic DK. Imunobiološki i klinički značaj krvnih grupa. Beograd: IntraNet Communication; 2009:29-43.
12. Mollison PL, Engelfriet PL, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine. 9th ed. Oxford: Blackwell scientific publications;1994:546-611.
13. Garratty G. The significance of IgG on the red cell surface. *Transfusion Medicine Reviews* 1987;1(1):47-57.

14. Zantek ND, Koepsell SA, Tharp DR, Cohn CS. The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis. *Am J Hematol* 2012;87(7):707-9.
15. Marisavljevic D, Mihaljevic B, Elezovic I, editors. *Klinicka hematologija*. Beograd: Zavod za udžbenike; 2012:937-89.
16. Grgicevic D, editor. *Transfuzijska medicina u klinickoj praksi*. Zagreb: Medicinska zaklada; 2006:235-254.
17. Meyer F, Raba M. Le test de Coombs direct. *Revue Francaise des Laboratories* 1996;282(1996):198-8.
18. Cid J, Ortin V, Excoda L. The direct antiglobulin test in a hospital setting. *Immunohematology* 2003;19(1):16-8.
19. Balint B. *Transfuziologija*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2004
20. Zarandona JM, Yazer MH. The role of the Coombs test in evaluating hemolysis in adults. *CMAJ* 2006;174(3):305-7.
21. Das SS, Chaudhary R, Khetan D. A comparison of conventional tube test and gel technique in evaluation of the direct antiglobulin test. *Hematology* 2007;12(2):175-8.
22. Nathalang O, Chuansumrit A, Prayoonwiwat W. Comparison between the conventional tube technique and the gel technique in direct antiglobulin tests. *Vox Sang* 1997;72(3):169-71.
23. Bicakci Z, Ozturkmen S, Akyay A, Olcay L. False positive result of the direct antiglobulin test (DAT): the role of the elevated level of immunoglobulin G. *Transfusion medicine*. 2012;29(7):611-19.
24. Nelken D, Gurevitch J, Gilboa-Garber N. Direct anti-globulin consumption test for detection of immune antibodies. *The Lancet* 1961;277(7180):742-44.
25. Barcellini W, Revelli N, Imperiali FG, Villa MA, Manera MC et al. Comparison of traditional methods and mitogen-stimulated direct antiglobulin test for detection of anti-red blood cell autoimmunity. *International Journal of Hematology* 2010;91(5):762-69.
26. Van Longhem J.J, Van Der Hart M, Hijmans W, Shuit H.R.E. The incidence and significance of complete and incomplete white cell antibodies with special

- reference to the use of the Coombs consumption test. *Vox Sang* 1958;3(3):203-23.
27. Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawston AC. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocite leukemia. *NEJM* 2008;359:575-83.
 28. Shanafelt T, Hanson CA. Monoclonal B-cell lymphocytosis: definitions and natural history. *Leuk Lymphoma* 2009;50:493-7.
 29. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010;46:765-81.
 30. Wright G, Tan B, Rosenwald A. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275-82.
 31. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008;111(8):3941-67.
 32. Maloney D, Smith B, Rose A. Rituximab: Mechanism of action and resistance. *Semin Oncol* 2005;23:2215-23.
 33. Mauro FR, FoaCLLSG). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2007;110:625.
 34. Tucker WL, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008;112:1570-80.
 35. Cimmino A, Calin GA, Fabri M. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(39):13944-9.
 36. O'Brien S, Gribben JG. *Chronic Lymphocytic Leukemia*. Informa Healthcare USA, Inc. 2008.
 37. Oscier D, Fegan C, Hillmen P. Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2004;125:294-317.
 38. Horner J, Ries LAG, Krapcho M. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006*. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2009.
 39. Ricci F, Tedeschi A, Vismara E, Colombo C, Veronese S. Should a positive antiglobulin test be considered a prognostic predictor in chronic lymphocit leukemia? *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013;13(4):441-6.
 40. Landgren O, Engels EA, Pfeiffer RM. Autoimmunity and susceptibility to Hodgkin lymphoma: A population-based case-control study in Scandinavia. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1321-30.

41. Kupperts R, Rajewsky K, Zhao M. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological section show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10962-6.
42. Ushmorov A, Leithauser F, Sakk O. Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006;107:2493-2500.
43. Kaplan HS: Hodgkin's Disease. Harvard University Press, Cambridge, MA, 1980.
44. Engert D.A, Eichenauer A, Dreyling M. Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009;20(4):108-109.
45. Eisner E, Ley AB, Mayer K. Coomb's positive Hemolytic anemia in Hodgkin's disease. *Ann Int Med* 1967;66:258-73.
46. Sparano JA, Weller E, Nazeer T. Phase 2 trial of infusional cyclophosphamide, doxorubicin, and etoposide in patients with poor-prognosis, intermediate-grade non-Hodgkin lymphoma: An Eastern Cooperative Oncology Group trial (E3493). *Blood* 2002;100(5):1634-40.
47. Levine AM, Thornton P, Forman SJ, Van Hale P, Holdorf D, Rouault CL, et al. Positive Coombs test in Hodgkin's disease: significance and implications. *Blood* 1980;55:607-11.
48. Fischer SG, Fischer RI. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 2004;23:38-43.
49. Kiefer CR, Snyder LM. Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr Opin Hematol* 2000;7(2):113-116.
50. Arese P, Turrini F, Schwarzer E. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem* 2005;16(4-6):133-146.
51. Oldenborg PA. Role of CD47 in erythroid cells and in autoimmunity. *Leuk Lymphoma* 2004;45(7):1319-1327.
52. Ney PA. Normal and disordered reticulocyte maturation. *Curr Opin Hematol* 2011;18(3):152-157.

53. Gonzalez-Casas R, Jones EA, Moreno-Otero R. Spectrum of anemia associated with chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2009;15(37):4653-4658.
54. De Maria R, Testa U, Luchetti L, et al. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* 1999;93(3):796-803.
55. Liu Y, Pop R, Sadegh C, Brugnara C, Haase VH, Socolovsky M. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood* 2006;108(1):123-133.
56. Steinberg M, Benz E, Adewoye A. Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobin. In: Hoffman: Hematology: Basic Principles and Practice, 5th ed. Churchill Livingstone, 2008.
57. Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 1997;90:1345-64.
58. Testa U. Apoptotic mechanism in the control of the erythropoiesis. *Leukemia* 2004;18:1176-99.
59. Damen JE, Krystal G. Early events in erythropoietin-induced signaling. *Exp Hematol* 1996;24:1455-9.
60. While SH, Ladokhnin AS, Jayasinghe S, Hristova K. How membranes shape protein structure. *J Clin Chem* 2001;276:395-8.
61. Prchal JT, Xylina TG. Red cell enzymes. *Hematology* 2005;19-23.
62. Weatherall DJ, Clegg JB. *Thalassemia syndromes*. 4th ed. Oxford. Blackwell Scientific 2001.
63. Fleming RE, Bacon BR. Orchestration of iron homeostasis. *N Engl J Med* 2005;352:1741-7.
64. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 2005;122:789-801.
65. Conrad ME, Umbreit JN. Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:336-55.
66. Pietrangelo A. The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32:131-8.
67. Knovich MA. Ferritin for the clinician. *Blood Rev* 2009;23:95-104.
68. Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 2002;99:3505-16.
69. Recalcati S, Locati M, Marini A. Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *Eur J Immunol* 2010;40:824-35.

70. Nemeth E, Nicolas G, Chauvet C, Viatte L. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation. *J Clin Invest* 2002;110:1037-44.
71. Goodnough LT, Nemeth E, Ganz T. Detection, evaluation and management of iron-restricted erythropoiesis. *Blood* 2010;116:4754-61.
72. Carmel R. Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu Rev Med* 2000;51:357-75.
73. Beutler E, Waalen J. The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration. *Blood* 2006;107:1747-50.
74. Wickramasinghe SN. Diagnosis of megaloblastic anemias. *Blood Rev* 2006;20:299-318.
75. Petz LD, Garraty G. *Immune Hemolytic Anemias*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004:261-317.
76. Leger RM, Co A, Hunt P, Garraty G. Attempts to support an immune etiology in 800 patients with direct antiglobulin test-negative hemolytic anemia. *Immunohematology* 2010;26(4):156-60.
77. Garraty G. Immune hemolytic anemia associated with negative routine serology. *Semin Hematol* 2005;42:156-64.
78. Lambert JF, Nydegger UE. Geoepidemiology of autoimmune hemolytic anemia. *Elsevier* 2010;9(5):350-4.
79. Gupta R, Singh Dk, Singh S, Singh T. Coomb's negative autoimmune hemolytic anemia: a diagnostic dilemma for the hematologist. *Indian J Pathol Microbiol* 2008;51:571-72.
80. Packman CH. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies. *Blood Reviews* 2008;22(1):17-31.
81. Garraty G, Nance SJ. Correlation between in vivo hemolysis and the amount of red cell-bound IgG measured by flow cytometry. *Transfusion* 1990;30(7):617-21.
82. Petz LD, Garraty G. *Immune hemolytic anemias*. 2nd ed. Burlington: Elsevier Inc; 2004:222-253.
83. Packman CH. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies. *Blood Rev* 2008;22(1):17-31.

84. Kamesaki T, Oyamada T, Omine M, Ozawa K, Kajii E. Cut-off value of red-blood-cell IgG for the diagnosis of Coombs-negative autoimmune hemolytic anemia. *American Journal of Hematology* 2009;84(2):98-101.
85. Weiss G, Goodnough TL. Anemia in chronic disease. *N Engl J Med* 2005;352:43-55.
86. Guralnik J, Eisenstaedt RS, Ferrucci L. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia. *Blood* 2004;104:2263-8.
87. Izaks GJ, Westendorp RGJ, Knook DL. The definition of anemia in older persons. *JAMA* 1999;281:1714-7.
88. Arts AS, Fergusson D, Drinka PJ. Mechanism of unexplained anemia in the nursing home. *J Am Geriatr Soc* 2004;52:423-7.
89. Erchler WB, Artz AS, Kandahari MM. Recombinant erythropoietin treatment of anemia in older adult. *J Am Geriatr Soc* 2001;49:1396-7.
90. Bergamaschi G, Villani L. Serum hepcidin: a novel diagnostic tool in disorders of iron metabolism. *Haematologica* 2009;94:1631-3.
91. Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S, Abeloff MD, Spivak JL. Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. *N Engl J Med* 1990;322(24):1689-1692.
92. Beguin Y, Yerna M, Loo M, Weber M, Fillet G. Erythropoiesis in multiple myeloma: defective red cell production due to inappropriate erythropoietin production. *Br J Haematol* 1992;82(4):648-653.
93. Kerbauy DB, Deeg HJ. Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol* 2007;35(11):1739-1746.
94. Maciejewski JP, Risitano A. Hematopoietic stem cells in aplastic anemia. *Arch Med Res* 2003;34(6):520-527.
95. Tefferi A, Beer PA. The pathogenesis of essential thrombocythaemia. *Curr Opin Hematol* 2011;18:323-9.
96. Morris VK, Spraker HL, Howard SC, Ware RE, Reiss UM. Severe thrombocytopenia with iron deficiency anemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2010;27(5):413-419.

97. Barbui T, Thiele J, Passamonti F. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol* 2011;29(23):3179-3184.
98. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ* 2008;86(6):480-487.
99. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet* 2008;372(9647):1411-1426.
100. D'Onofrio G, Chirillo R, Zini G, Caenaro G, Tommasi M, Micciulli G. Simultaneous measurement of reticulocyte and red blood cell indices in healthy subjects and patients with microcytic and macrocytic anemia. *Blood* 1995;85(3):818-823.
101. Koury MJ, Horne DW, Brown ZA. Apoptosis of late-stage erythroblasts in megaloblastic anemia: association with DNA damage and macrocyte production. *Blood* 1997;89(12):4617-4623.
102. Dutt S, Narla A, Lin K. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* 2011;117(9):2567-2576.
103. Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood* 2008;111(9):4446-4455.
104. Moldovan GL, D'Andrea AD. How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet* 2009;43:223-249.
105. Koury MJ, Price JO, Hicks GG. Apoptosis in megaloblastic anemia occurs during DNA synthesis by a p53-independent, nucleoside-reversible mechanism. *Blood* 2000;96(9):3249-3255.
106. Savage DG, Ogundipe A, Allen RH, Stabler SP, Lindenbaum J. Etiology and diagnostic evaluation of macrocytosis. *Am J Med Sci* 2000;319(6):343-352.
107. Chen JJ. Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias. *Blood* 2007;109(7): 2693-2699.
108. Suragani RN, Zachariah RS, Velazquez JG, et al. Heme-regulated eIF2_ kinase activated Atf4 signaling pathway in oxidative stress and erythropoiesis. *Blood* 2012;119(22):5276-5284.

109. Cullis JO. Diagnosis and management of anaemia of chronic disease: current status. *Br J Haematol* 2011;154(3):289-300.
110. Skikne BS, Punnonen K, Caldron PH, et al. Improved differential diagnosis of anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: a prospective multicenter evaluation of soluble transferrin receptor and the sTfR/log ferritin index. *Am J Hematol* 2011;86(11):923-927.
111. Brugnara C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. *Clin Chem* 2003;49(10):1573-1578.
112. Thomas C, Kobold U, Balan S, Roeddiger R, Thomas L. Serum hepcidin-25 may replace the ferritin index in the Thomas plot in assessing iron status in anemic patients. *Int J Lab Hematol* 2011;33(2):187-193.
113. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC. Morphological changes in erythroblasts during erythropoietin-induced terminal differentiation in vitro. *Exp Hematol* 1988;16(9):758-763.
114. Kelley LL, Koury MJ, Bondurant MC, Koury ST, Sawyer ST, Wickrema A. Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietin sensitivities: A mechanism for controlled erythrocyte production. *Blood* 1993;82(8):2340-2352.
115. Koury MJ, Koury ST, Kopsombut P, Bondurant MC. In vitro maturation of nascent reticulocytes to erythrocytes. *Blood* 2005;105(5):2168-2174.
116. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med* 2011;62:347-360.
117. Buckstein R, Friedlich J, Zhang L. Estimating the prevalence of myelodysplastic syndromes in patients with unexplained cytopenias: A retrospective study of 322 bone marrows. *Leukemia Res* 2009;33:1313-8.
118. Steensma DP, Bennett JM. The myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 2006;81:104-30.
119. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
120. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes(MDSs). *Blood* 2009;114(15):3285-91.

121. Sawada K, Ieko M, Notoya A. Role of cytokines in leukemic type growth of myelodysplastic CD34+ cells. *Blood* 1996;88:319-327.
122. Clark R, Hoy T, Jacobs A. Granulocyte and monocyte surface membrane markers in the myelodysplastic syndromes. *J Clin Pathol* 1985;38:301-4.
123. Scott BL, Wells DA, Loken MR, Myerson D, Leisenring WM. Et al. Validation of a flow cytometric scoring system as a prognostic indicator for posttransplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2008;112(7):2681-6.
124. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100(7):2292-302.
125. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL. World Health Organization of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC Press, Lyon 2008.
126. DeAngelo D, Stone R. Chapter 67. Myelodysplastic syndromes: Biology and Treatment. In: Hematology-Basic principles and practice. Hoffman R, Benz E, Shattil S et al. (Eds). 5th Edition, Churchill Livingstone,2008.
127. Cheson BD, Benett JM, Kantarjian H. Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000;96:3671-74.
128. Keyhani A, Jendiroba DB, Freireich EJ. Angiogenesis and leukemia. *Leuk Res* 2001;25:639-644.
129. Chesonj BD, Greenberg P, Bennett J. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood* 2006;108(2):419-25.
130. Ballem PJ, Segal GM, Stratton JR. Mechanism of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: evidence of borh impaired platelet production and increased platelet clearance. *J Clin Invest* 1987;80:33-40.
131. Orsini F, Gregory S, Dale M, Fitzpatrick J, Cohen E. A quantitative determination for the detection of immunoglobulin (IgG) on the surface of the platelets. *Human Immunology*. 1981;3(2):153-61.
132. Jovanovic D, Elezovic I, Beslac-Bumbaširevic Lj, Kovacevic M, Jovanovic R. Sindrom HELP (HELLP): Hemoliza, povišeni enzimi jetre i trombocitopenija (Prikaz bolesnika), *Srp arh celok lek* 1995;123(5-6):161-3.

133. Kelton JG. Autoimmune thrombocytopenia. Educational Program Book ISH-EHA Combined Haematology Congress, Amsterdam, 4-8 July 1998;1-7.
134. George JN. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *NEJM* 2006;354:1927-35.
135. George JN. Evaluation and management of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Intensive Care Med* 2007;22:82-9.
136. Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood* 2001;98:1654-61.
137. Lammle B, Kremer Hovinga JA, George JN. Acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: ADAMTS13 activity, anti-ADAMTS13 autoantibodies and risk of recurrent disease. *Haematol* 2008;93:172-7.
138. Desch K, Motto D. Is there a shared pathophysiology for thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic-uremic syndrome? *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2457-60.
139. Mannuci PM. Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome: much progress and many remaining issues. *Haematologica* 2007;92:878-80.
140. Rizvi MA, Vesely SK, George JN, Chandler L, Duvall D, Smith JW. Complications of plasma exchange in 71 consecutive patients treated for clinically suspected thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Transfusion* 2000;40:894-901.
141. Roberto Stasi R, Provan D. Helicobacter pylori and Chronic ITP. *Hematology* 2008;206-11.
142. Imbach P, Barandun S, d Appuzo V. High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet* 1981;1:1228-31.
143. Salama A, Kifel V, Amberg R, Mueller-Eckhardt C. Treatment of autoimmune thrombocytopenic purpura with rhesus antibodies (anti-RhD). *Blut* 1984;1:404-5.
144. Bussel JB, Kuter DJ, George JN. AMG 531, a thrombopoiesis-stimulating protein, for chronic ITP. *N Engl J Med* 2006;355(16):1672-81.
145. Xiros N, Binder T, Anger B, Böhlke J, Heimpel H. Idiopathic thrombocytopenic purpura and Autoimmune hemolytic anemia in Hodgkin's disease. *Eur J Haematol* 1988;40:437-41.

146. Sthoeger Z, Sharabi A, Mozes E. Novel approaches to the development of targeted therapeutic agents for systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity* 2014;54:60-71.
147. Bernatsky, Boivin JF, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladmann D. et al. Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006;54:2550-7.
148. Im SH, Barchan D, Fuchs S, Souroujon MC. Suppression of ongoing experimental myasthenia by oral treatment with an acetylcholine receptor recombinant fragment. *J Clin Invest* 1999;104:1723-30.
149. Im SH, Barchan D, Fuchs S, Souroujon MC. Mechanism of nasal tolerance induced by a recombinant fragment of acetylcholine receptor for treatment of experimental myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2000;111:161-8.
150. Drachman DB, Okumura S, Adams RN, McIntosh KR. Oral tolerance in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1996;778:258-72.
151. Barchan D, Asher O, Tzartos SJ, Fuchs S, Souroujon MC. Modulation of the anti-acetylcholine receptor response and experimental autoimmune myasthenia gravis by recombinant fragments of the acetylcholine receptor. *Eur J Immunol* 1998;28:616-24.
152. Aarli JA, Tonder O. Antiglobulin consumption test with sera from patients with myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol.* 1970;7(1):11-21.
153. Barchan D, Souroujon MC, Im SH, Antozzi C, Fuchs S. Antigen-specific modulation of experimental myasthenia gravis: nasal tolerization with recombinant fragments of the human acetylcholine receptor alpha-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8086-91.
154. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787- 93.
155. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998;8:275-83.
156. Maiti PK, Feferman T, Im SH, Souroujon MC, Fuchs S. Immunosuppression of rat myasthenia gravis by oral administration of a syngeneic acetylcholine receptor fragment. *J Neuroimmunol* 2004;152:112-20.

157. Im SH, Barchan D, Feferman T, Raveh L, Souroujon MC, Fuchs S. Protective molecular mimicry in experimental myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2002;126:99-106.
158. Souroujon MC, Brenner T, Fuchs S. Development of novel therapies for MG: studies in animal models. *Autoimmunity* 2010;43:446-60.
159. Feferman T, Im SH, Fuchs S, Souroujon MC. Breakage of tolerance to hidden cytoplasmic epitopes of the acetylcholine receptor in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2003;140:153-8.
160. Vanderlugt CL, Miller SD. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:85-95.
161. Souroujon MC, Barchan D, Fuchs S. Analysis and modulation of the immune response of mice to acetylcholine receptor by anti-idiotypes. *Immunol Lett* 1985;9:331-6.
162. Aarli JA, Tonder O. Antiglobulin consumption test with sera from patients with myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol* 1970;7(1):11-21.
163. Van Loghem JJ, van der Hart M, Borsten H. The occurrence of complete and incomplete white cell antibodies. *Vox Sang* 1957;2:257.
164. Garratty G. The James Blundell Award Lecture 2007: do we really understand immune red cell destruction? *Transfus Med* 2008;18:321-334.
165. Thedsawad A, Taka O, Wanachiwanawin W. Development of flow cytometry for detection and quantitation of red cell bound immunoglobulin G in autoimmune hemolytic anemia with negative direct Coombs test. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2011;29:364-367.
166. Fabijanska-Mitek J, Poglod R, Adamowicz-Salach A, Lopienska H. Quantitation of red cell-bound IgG by an enzyme-linked antiglobulin test in the patients with warm-type autoimmune haemolytic anaemia. *Clin Lab Haematol* 2006;28(4):241-244.
167. Dittmar K, Procter JL, Cipolone K, Njoroge JM, Miller J et al. Comparison of DATs using traditional tube agglutination to gel column and affinity column procedures. *Transfusion* 2001;41:1258-1262.

168. Cid J, Nogués N, Montero R, Hurtado M, Briega S et al. Comparison of three microtube column agglutination systems for antibody screening: DG Gel, DiaMed-ID and Ortho BioVue. *Transfus Med* 2006;16:131–136.
169. Gilliard BC, Leddy JP, Vaughan JH. The detection of cell-bound antibody on complement-coated human red cells. *J Clin Invest* 1970;49:898-906.
170. Mollison PH, Crome P, Hugh-Jones NC, Rocha E. Rate of removal from circulation of red cells sensitized with different amount of antibody. *B J Haematol* 1965;11:461-70.
171. Hannon JL. Management of blood donors and blood donations from individuals found to have a positive direct antiglobulin test. *Transfusion Medicine Reviews* 2012;26(2):142-52.
172. Win N, Islam SI, Peterkin MA, Walker ID. Positive direct antiglobulin test due to antiphospholipid antibodies in normal healthy blood donors. *Vox Sang* 1997;72(3):182-4.
173. Elghetany MT, Banki K. Erythrocytic disorders. In: McPherson RA, Pincus MR, eds. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22nd ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders; 2011:32.
174. Bicakci Z, Ozturkmen S, Akyay A, Olcay L. False positive result of the direct antiglobulin test (DAT): the role of the elevated level of immunoglobulin G. *Pediatr Hematol Oncol* 2012;29(7):611-9.
175. Shnaider A, Basok A, Rogachev BV, Zlotnik M, Tomer A. Severe Coomb's-negative autoimmune hemolytic anemia in a kidney transplant patient. *Am J Nephrol* 2001;21(6):494-7.
176. Evans RS. Autoantibodies in hematologic disorders. *Stanf Med Bull* 1977;13:152-66.
177. Nasongkla M, Humert J, Chaplin H. Weak “false positive“ direct antiglobulin test reactions with polyspecific antiglobulin reagents: lack of correlation with red-blood-cell-bound C3d. *Transfusion* 1982;22(4):273-5.
178. Postoway N, Nance SJ, Garratty G. Variables affecting the enzyme-linked antiglobulin test when detecting and quantitating IgG red cell antibodies. *Med Lab Sci* 1985;42(1):11–19.

179. Garratty G. Immune hemolytic anemia associated with negative routine serology. *Semin Hematol* 2005;42:156–164.
180. Braga GW, Bordin JO, Moreira Júnior G, Kuroda A. Laboratory diagnosis of auto-immune hemolytic anemia: characteristics of the manual direct test of Polybrene. *Rev Assoc Med Bras* 1998;44:16–20.
181. Burkart P, Rosenfield RE, Hsu TC, Wong KY, Nusbacher J, Shaikh SH, Kochwa S. Instrumented PVP-augmented antiglobulin tests. I. Detection of allogeneic antibodies coating otherwise normal erythrocytes. *Vox Sang* 1974;26:289–304.
182. Hsu TC, Rosenfield RE, Burkart P, Wong KY, Kochwa S. Instrumented PVPaugmented antiglobulin tests. II. Evaluation of acquired hemolytic anemia. *Vox Sang* 1974;26:305–325.
183. MacKenzie MR. Positive direct Coombs tests with anti-IgA antiserum. *Vox Sang* 1970;19:451–456.
184. Kay NE, Douglas SD, Mond JJ, Flier JS, Kochwa S, Rosenfield RE. Hemolytic anemia with serum and erythrocyte-bound low-molecular-weight IgM. *Clin Immunol Immunopathol* 1975;4:216–225.
185. Szymanski IO, Huff SR, Selbovitz LG, Sherwood GK. Erythrocyte sensitization with monomeric IgM in a patient with hemolytic anemia. *Am J Hematol* 1984;17:71–77.
186. Arndt P, Leger R, Garratty G. Serological findings in autoimmune hemolytic anemia associated with immunoglobulin M warm antibodies. *Immunohematology* 2009;49:235–242.
187. MacKenzie MR. Positive direct Coombs tests with anti-IgA antiserum. *Vox Sanguinis* 1970;19(5-6):451-56.
188. Handbook for guideline development. Geneva, World Health Organization, March 2010.
189. Engelfriet CP, Van Longhem JJ. Studies on leucocyte iso- and auto-antibodies. *Br J Haematol* 1961;7:223–38.
190. Loughran T. Anemia in lymphoproliferative disorders. *Cancer control journal* 1998;5(2):51-53.

191. Steffen C. Results obtained with the antiglobulin consumption test and investigations of autoantibody eluates in immunohematology. *J Lab Clin Med* 1960;55:9.
192. Helken D. The nature of coating globulin causing a positive antiglobulin consumption test. *Harefuah* 1961;60:83-4.
193. Bennet J, Catovsky D, Flandrin G. FAB cooperative Group Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982;51:189-99.
194. Prchal J, Throckmorton D, Varrol A. A common progenitor for myeloid and lymphoid cells. *Nature* 1978;274:590-1.
195. Moulinier J. Le test de consommation d'antiglobuline appliqué à la recherche des anticorps anti-thrombocytes. *Sang* 1955;26(8):811-821
196. Cines DB, Schreiber AD. Immune thrombocytopenia. Use of a Coombs antiglobulin test to detect IgG and C3 on platelets. *N Engl J Med* 1979;100(3):106-11.
197. Fagiolo E. Immunochemical study of incomplete platelet autoantibodies by the anti-globulin consumption test (AGCT) with specific anti-immunoglobulin sera. *Journal of Immunological Methods* 1976;9:225-29.
198. D.E. Wright, R.P. Rosovsky, M.Y. Platt, Case 36-2013: A 38-year-old woman with anemia and thrombocytopenia, *N Engl J Med* 369 (2013) 2032-2043.
199. Porta C, Caporali R, Montecucco C. Thrombotic thrombocytopenic purpura and autoimmunity: a tale of shadows and suspects. *Haematologica* 1999;84:260-9.
200. Kwaan HC, Soff GA. Management of thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Semin Hematol* 1997; 34:159-66.
201. Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV . Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin* 1951;38(1):1-10.
202. Shulman NR, Marder CJ, Weinrach VJ. Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura. Physiologic, serologic and isotopic studies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1965;124:499-542

203. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L, Crowther MA. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood* 2011;117:4190-4207.
204. Cines DB, Schreiber AD. Immune thrombocytopenia. Use of a Coombs antiglobulin test to detect IgG and C3 on platelets. *N Engl J Med* 1979;300(3):106-11.
205. Dausset J, Brecy H. Test direct de consommation de l'antiglobuline sur les leucocytes et les plaquettes de certains malades atteints de pancytopenies idiopathiques. *Vox Sang* 1958;3(3):197-203.
206. Graafland H, Seignalet J, Donadio D, Navarro M, Izarn P. Our experience with antiglobulin consumption (Dixon test) in the study of antibodies bound to platelets. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 1981;24(4):389-404.
207. Aarli JA. Binding of γ -globulin fragments to muscle tissue. *Clin Exp Immunol* 1970;7(1):23-30.
208. O'Keeffe DW. The Coombs Consumption Test for Systemic Lupus Erythematosus. Yale University;1958.