

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Dr Olivera Šerbić Nonković

Ispitivanje efektivnosti i podnošljivosti
transfuzija trombocita kod bolesnika
uzrasta od jednog meseca do 18 godina

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
MEDICAL FACULTY

Dr Olivera Šerbić Nonković

Analysis of the effectiveness and
tolerability of platelet transfusions in
patients one month to 18 years aged

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2016.

Mentor doktorske disertacije:

Prof. dr Dragana Vujić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor doktorske disertacije:

Prim. dr Dobrila Veljković, PhD, N sar.

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

1. Prof. dr Dragomir Marisavljević, redovan profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, predsednik komisije
2. Doc. dr Miloš Kuzmanović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, član komisije
3. Prof. dr Svetlana Vojvodić, vanredni profesor Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu, član komisije

Ispitivanje efektivnosti i podnošljivosti transfuzija trombocita kod bolesnika uzrasta od jednog meseca do 18 godina

REZIME

Uvod: Primena trombocita, bilo terapijski ili preventivno, može biti praćena neadekvatnim porastom broja trombocita u cirkulaciji zbog refrakternosti. Drugi problem pri primeni transfuzija trombocita je pojava neželjenih reakcija na trombocite, najčešće po tipu alergijskih i febrilnih nehemoliznih transfuzijskih reakcija.

Cilj: Utvrditi kod kojih bolesnika na potpornoj terapiji transfuzijama trombocita postoji refrakternost na transfuzije trombocita, koja je njena etiologija (ne imuna refraktornost/imuna refraktornost) te proceniti efektivnost doza trombocita s negativnim rezultatom interreakcije primenjenih kod bolesnika s imunom refrakternosti. Utvrditi učestalost alergijskih i febrilnih nehemoliznih transfuzijskih reakcija u ispitivanoj gupi pedijatrijskih bolesnika i razliku prema adultima. Odrediti nivoe interleukina IL6 i IL8 u uzorcima plazme bolesnika i iz doza trombocita koje su izazvale febrilnost. Hemokulturama utvrditi da li postoji bakterijska kontaminacija doza trombocita ili bakterijska infekcija kod bolesnika. Kod bolesnika s alergijskim reakcijama primeniti doze trombocita koje imaju aditivni rastvor za trombocite umesto plazme davaoca, nakon primene proceniti njihovu efektivnost.

Materijal i metode: Ispitivanje je urađeno u periodu 2011-2014. godine. U Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić", na Odeljenju za transfuziju krvi urađeni su imunoserološki testovi određivanja krvne grupe, direktnog i indirektnog humanog antiglobulin testa, interreakcije na doze trombocita, kao i skrining testovi hemostaze, fibrinogen po Klausu, vWF antigen i D-dimeri. U Biohemijskoj laboratoriji u Odseku za kliničku hemiju i hematologiju urađena je krvna slika, biohemijski parametri i C reaktivni protein. U Institutu za transfuziju krvi Srbije, u Odeljenju za tipizaciju tkiva urađena je analiza anti-HLA antitela a u Zavodu za transfuziju krvi Vojvodine ispitivanje antitrombocitnih anti-HPA antitela. Ispitivanjem je obuhvaćeno 239 bolesnika koji su primali transfuzije trombocita u terapijske ili preventivne svrhe u trogodišnjem periodu u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić". Bolesnici su lečeni u Službi za ispitivanje i lečenje hematoloških i onkoloških bolesnika, Odeljenju za transplantaciju kostnesrži i Službi za pedijatrijsku intenzivnu

negu i lečenje. Nivoi IL-6 i IL-8 određivani su imunoesej analizom. Anti-leukocitna (anti-HLA) i anti-trombocitna antitela (anti-HPA) su identifikovana Luminex protočnom citometrijom.

Rezultati: Refrakternost je posmatrana u odnosu na porast KBT, i ispoljila se kod 43 (17.55%) bolesnika. Bolesnici sa refrakternosti primali su češće transfuzije trombocita te je interval između doza bio kraći 4.74 ± 15.88 dana, prema ne refraktornim bolesnicima 5.05 ± 6.20 dana, $p < 0.001$.

Kod 22 bolesnika (51.2%) refrakternost je bila imunog porekla - identifikovana su antitela usmerena na HLA ili HPA antigene na trombocitima. Jedanaest bolesnika (50%) imalo je samo anti-HLA antitela, četvero isključivo anti-HPA antitela (18.2%), a 7 (31.8%) bolesnika imalo je i anti-HLA i anti-HPA antitela. Kod četiri bolesnika diferencirana su anti-HPA antitela. Po jedno antitelo imala su tri bolesnika i to antitelo anti-Gp IIBIIIa, anti-Gp IaIIa i anti-Gp Ib/IX. Jedan bolesnik imao je dva anti-HPA antitela anti-Gp IIBIIIa i anti-Gp IaIIa. Prisustvo anti-HLA $p < 0.001$ i anti-HPA antitela $p < 0.001$ statistički je značajno bilo povezano sa pojavom refrakternosti.

Statistički značajni ne imuni etiološki faktori bili su: krvarenje $p = 0.025$, febrilnost $p = 0.038$, mukozna oštećenja $p = 0.045$, lekovi s dejstvom na trombocite $p = 0.032$, dijareja $p = 0.002$, autologne transplantacije PMČH $p = 0.003$. Refrakterni bolesnici ispoljili su i transfuzijske reakcije, od ukupno njih 13 (30.2%), 6 (13.9) je imalo alergijsku reakciju, troje FNHTR (6.97%), a četiri bolesnika (4.65%) imala su ponovljene reakcije: dve ponovljene alergijske reakcije, jednu ponovljenu FNHTR na trombocite a jedan bolesnik ponovljenu FNHTR ali na dozu eritrocita. Sva četiri bolesnika imala su imunu refrakternost. Utvrđeno je postojanje povezanosti između alergijskih transfuzijskih reakcija i refrakternosti kod bolesnika sa brojem trombocita nižim od $10 \times 10^9/l$ $p < 0.001$.

Kod ukupno 52 bolesnika zabeležimo je 70 transfuzijskih reakcija. Najčešće su bile alergijske reakcije (72,8%), kao druge febrilne nehemolizne transfuzijske reakcije (17,1%). Najveći broj reakcija izazvali su koncentrovani trombocita dobijeni iz "buffy coata" (73,5%). Bolesnici sa infekcijom nakon transfuzije trombocita na koje su ispoljili febrilnu nehemoliznu transfuzijsku reakciju (FNHTR) imali su najviši nivo IL-6 483.30 ± 1041.79 pg/ml ($p = 0,020$), slede bolesnici sa febrilnošću, IL-6 302.52 ± 720.04 pg/ml ($p = 0,004$). Nivo IL-8 u jedinicama trombocita koje su izazvale transfuzijsku

reakciju bila je 95.66 ± 319.10 pg/ml, što je značajno više ($p=0,001$) u poređenju sa kontrolom. Kumulativna incidencija FNHTR reakcija u odnosu na broj doza za petogodišnji period je 0.04%. Kumulativna incidencija alergijskih reakcija u odnosu na broj doza za petogodišnji period je 0.17%, Bolesnicima sa alergijskim reakcijama primenjeni su pulirani trombociti u aditivnom rastvoru.

Zaključak: Pojava refrakternosti na transfuzije trombocita u našoj grupi pedijatrijskih hematoonkoloških bolesnika manje je česta u odnosu na literaturne podatke o refrakternosti adultnih bolesnika. Refrakternost je najčešće bila posledica udruženih neimunih i imunih etioloških faktora. Aloantitela na trombocite stvorilo je 51.2% bolesnika, identifikovana su antitela usmerena na HLA ili HPA antigene na trombocitima. U grupi bolesnika sa imunom refrakternosti statistički značajno su bili niži porast KBT i %OT, broj trombocita je duži broj dana bio ispod $10 \times 10^9/l$, bolesnici u primali veći broj transfuzija trombocita i u frekventnijem režimu.

Dominantan etiološki mehanizam za febrilnu nehemoliznu transfuzijsku reakciju u našoj studiji su leukocitima produkovani citokini akumulirani tokom skladištenja 96.2%. Etiopatogeneza izazvane febrilne nehemolizne transfuzijske reakcije IL-6 i IL-8 je različita. Dominantan udeo u nastanku febrilne nehemolizne transfuzijske reakcije u dečijoj populaciji pripada faktorima vezanim za status pacijenta (prisustvo infekcije, inflamacije).

Ključne reči: trombociti, refrakternost, transfuzijska reakcija, aditivni rastvor za trombocite PAS, interleukin

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Hematologija

Analysis of the effectiveness and tolerability of platelet transfusions in patients one month to 18 years aged

ABSTRACT

Objectives: Application of platelets, either therapeutically or prophylactically may be accompanied by an inadequate increase in the number of platelets in the circulation due to the refractoriness. Another problem in the application of platelet transfusion is the adverse reactions to platelets, usually by type of allergic and febrile nonhemolytic transfusion reactions. The chemotherapeutic treatment and post-transplant period in oncohematological pediatric patients is often complicated with thrombocytopenia refractory to platelet transfusion.

Aims: to show the incidence of platelet refractoriness using the corrected count increment (CCI) and the percent platelet recovery (PPR), as well as to examine the most common immune and non-immune causes of refractoriness. Additionally, relationship of refractoriness and bleeding with the occurrence of transfusion reactions were explored. We aimed to show less known aspects of most common transfusion reactions (allergic and febrile non-haemolytic transfusion reactions-FNHTR) in the pediatric population at the doses of platelet. This study investigated the role of the accumulated cytokines IL-6, IL-8 and presence of anti-platelet antibodies in the etiology of transfusion reaction in children.

Methods: Testing was done from 2011 to 2014. year. The Institute for Health Protection of Mother and Child of Serbia "Dr Vukan Čupić", at the Department of blood transfusion are made Immune-serology tests for determining blood groups, direct and indirect human antiglobulin test, the crossmatch of the dose of platelets and hemostasis screening tests, Klaus fibrinogen, vWF antigen and D-dimer. The Biomechanical Laboratory at the Department of Clinical Chemistry and Hematology underwent blood count, biochemical parameters and C-reactive protein. At the Institute for Blood Transfusion of Serbia, in the Department of Tissue Typing an analysis of anti-HLA antibodies in the Department of Blood Transfusion Testing antiplatelet anti-HPA antibodies. In the 3-year study period, 239 patients received platelet products. Data of reported transfusion reaction were collected and evaluated prospectively. The levels of IL-6 and IL-8 were determined using a immunoassay. Anti-HLA and anti-

HPA antibodies were identified by Luminex flow cytometry. Suitable platelet donors for alloimmunized recipients were selected using the LCT CDC and MASPAT test.

Results: A total of 43 (17.9%) patients demonstrated refractoriness to platelet transfusions. Exclusively immune refractoriness was diagnosed in 2 patients (4.6%), while non-immune cause was observed in 21 patients (48.8%). Both etiological factors were present in 20 patients (46.6%). The frequency of anti-HLA antibodies was 4.6%, anti-HPA antibodies 1.6%, and simultaneous presence anti-HLA and anti-HPA antibodies was 2.9% in our tested patients. In the group of refractory patients, Class I anti-HLA antibodies were detected in 11 patients (25.6%), anti-HPA antibodies in 4 patients (9.3%), and 7 patients (16.3%) had both anti-HLA and anti-HPA antibodies. The non-immune etiological factors were: bleeding ($p=0.025$), fever ($p=0.038$), mucosal damage ($p=0.045$), drug effected platelet function and count ($p=0.032$), as well as autologous PBSC ($p=0.003$). In a total of 52 patients were recorded 70 transfusion reactions. Allergic reactions occurred in most of the cases (72.8%), followed by FNHTR (17.1%). Platelets derived from buffy coat caused the majority of reactions (73.5%). Patients with infection after platelet transfusion with FNHTR had the highest levels of IL-6 483.30 ± 1041.79 pg/ml ($p=0.020$). Respectively, the febrile patients had IL-6, 302.52 ± 720.04 pg/ml ($p = 0.004$). The level of IL-8 in platelet units that caused transfusion reactions was 95.66 ± 319.10 pg/ml, which was significantly higher ($p=0.001$) compared to healthy control.

Conclusion: The occurrence of refractoriness in this group of oncohematological pediatric patients was less frequent compared to adult patients. This study demonstrates the importance of removing all of the non-immune causes of refractoriness (avoiding drugs that lower blood platelet count, curing bleeding, mucosal damage and fever) and to supply patients with cross matched negative units of platelets. The predominant etiologic mechanism for FNHTR in our study was leukocyte derived cytokine accumulation during storage 96.2%. Etiopathogenesis of FNHTR induced by IL-6 and IL-8 presented differently. We therefore conclude that in children a significant proportion in the etiology of FNHTR are patient-related factors (infection, inflammation).

Key words: platelet, transfusion reaction, refractoriness platelet pool in additive solution

Science field: Medicine

Specific science field: Haematology

SADRŽAJ

UVOD	1
I TROMBOCITI	1
Fiziologija i metabolizam.....	1
Poreklo trombocita	1
Građa trombocita.....	1
Vek trombocita.....	5
Funkcije i interrekcije trombocita	5
Interrekcije između trombocita i imunog sistema	6
Trombociti kao deo urođenog imunog sistema.....	6
Trombociti kao deo adoptivnog imunog sistema	8
Metabolizam trombocita	9
Deficit trombocita	9
II INDIKACIJE ZA PRIMENU TROMBOCITA KOD DECE	10
III. TROMBOCITNI PRODUKTI.....	11
Kolekcija, procesiranje, modifikacije i čuvanje.....	11
Trombociti dobijeni iz doza cele krvi	11
Trombociti dobijeni aferezom.....	12
Trombociti dobijeni puliranjem	12
Trombociti u aditivnom rastvoru za trombocite.....	12
IV EFEKTIVNOST TRANSFUZIJA TROMBOCITA.....	14
Refraktornost na transfuzije trombocita.....	14
Pojava i rizici za Rh (D) aloimunzaciju nakon primene Rh (D) + transfuzija trombocita.....	16
V PODNOŠLJIVOST TRANSFUZIJA TROMBOCITA	18
Transfuzijske reakcije	18

Hemolizne transfuzijske reakcije	19
Febrilne nehemolizne transfuzijske reakcije - FNHTR	21
Reakcije koje imaju i sliku FNHTR i alergijske reakcije	24
Alergijske transfuzijske reakcije	24
Piroгене –transfuzijske reakcije	26
S transfuzijom povezano akutno oštećenje pluća (TRALI)	29
S transfuzijom povezan Graft Versus Host Disease (TA-GVHD).....	31
Post-transfuzijska purpura	31
Druge reakcije izazavane transfuzijom	32
Hipotenzivna transfuzijska reakcija	32
Hiperkalemija.....	32
CILJ RADA	33
MATERIJAL I METODE.....	34
ISPITANICI	34
Kontrolna grupa	34
UZIMANJE UZORAKA KRVI	35
METODE ISPITIVANJA	35
Laboratorijske analize	37
Imunološka testiranja	41
Nivo IL6	41
Nivo IL8	41
Utvrđivanje prisustva anti-HLA antitela.....	42
Utvrđivanje prisustva anti-trombocitnih antitela	44
Statistička analiza.....	47
REZULTATI RADA	48
DISKUSIJA	71

ZAKLJUČCI.....	83
L I T E R A T U R A.....	86
SPISAK SKRAĆENICA.....	111
BIOGRAFIJA.....	114
PRILOZI.....	115

UVOD

I TROMBOCITI

Fiziologija i metabolizam

Trombocite je prvi put opisao Bizzozero 1882. kao krvne ćelije koje adheriraju za oštećen krvni sud (1). Brojnim funkcijama (adhezija, sekrecija, agregacija, aktivacija koagulacionog sistema) trombociti učestvuju u formiranju koaguluma i zaustavljalju krvarenje. Smanjen broj ili poremećaj funkcije trombocita dovode do krvavljenja zbog kojeg je potrebna njihova nadokanada.

Danas se zna da pored hemostaze, trombociti imaju ulogu modulacije urođenog i stečenog imuniteta, inicijacije inflamacije, u angiogenezi, aterosklerozi, razvoju limfnog sistema, zarastanju rana i rastu tumorskog tkiva (2).

Poreklo trombocita

Trombociti potiču od megakariocita kostne srži. Megakariociti su multinuklearne ćelije poreklom od pluripotentne matične ćelije hematopoeze. Faktor rasta trombocita je trombopoetin (TPO), proizvodi se u jetri. Povećanje cirkulišućeg TPO dešava se kao odgovor organizma na nizak broj trombocita. Pod utecajem TPO dolazi do povećanja megakariocita i do formiranja citoplazmatskih formi koje se nazivaju protrombociti. Protrombociti se pružaju po liniji endotelne ćelije krvnih sudova odakle njihovim pupanjem nastaju trombociti koji se otpuštaju u cirkulaciju. Dnevna produkcija trombocita iznosi 30 000-60 000 / μ l (3).

Grada trombocita

Veličina trombocita je 1-4 μ m. U mirovanju su diskoidnog oblika, koji potiče od marginalnih mikrotubularnih spirala. Membranski seklet baziran je na spektrinu a citosklet na aktinu. Nakon aktivacije iz centralnog dela tj. tela pružaju se filopodi a centralni deo se elevira dajući trombocitu izgled bodljikave sfere (2).

Na površini trombocita u stanju mirovanja nalazi se blizu 50 različitih membranskih struktura koje se grupišu u pet grupa: adhezivni molekuli, imuni molekuli, receptori, antigeni krvnih grupa, drugi molekuli Tabela br 1.

Tabela 1. Membranske strukture na površini trombocita

Adhezivni molekuli	Integrini CD29, CD41 CD49, CD49a, CD49b, CD49e CD49f,CD61,
	Selektini CD62/ P selektin
	Leucinom bogati protein CD42a, CD42d, CD42b β , CD42ba
	IgG superfamilija CD54/ICAM-1, CD31/PECAM-1
	CD44 varijante
	TM4 superfamilija CD9
Imunske molekule	MHC klasa I HLA -A,B,C
	Fc receptori CD32
	C receptori –komplement receptori C1q, C2, C4
	Regulatori aktivacije komplementa C59 MIRL
Receptori	Receptori primarnih agonista: trombina, epinefrina, TXA2, PAF, ADP
	Inhibitorni receptori β 2 adrenoreceptor, adenosinR prostaglandin D2
	Više namenski receptori CD36
	Drugi receptori CD151, CD110-TPO receptor
Antigeni krvnih grupa	ABO, P, Le, Ii
Drugi molekuli	Konstitutivni glikosfingolipidi Oligosaharidi Proteini α granula Proteini lizozoma TM4 superfamilija Za GPI vezani proteini

Takođe nalaze se sa glikoproteinima asocirani antigeni koji formiraju specifične humane trombocitne antigene (HPA) (engl. Human Platelet Antigen-HPA). Do danas, otkriveno ih je 33. Strukturalno glikoproteini Ia, IIa, IIIa, CD19, udružuju se u dimere koji imaju funkcionalne sposobnosti. Npr. GP Ib/IX: koji je receptor za von Willebrand faktor, GP IIb/IIIa: koji je receptor za fibrinogen.

Za aloantigene krvnogrupnog sistema ABO utvrđeno je da A antigena ima značajno više u krvnoj grupi A nego antigena B u krvnoj grupi B. Osobe krvne grupe A2 obično nemaju antigen A na trombocitima. Osobe A ili B krvne grupe sa vrlo visokim nivom antigena A ili B nazivaju se jakim ekspresorima. Antigeni P, Ii, Lewis čije je prisustvo dokazano na trombocitima nemaju klinički značaj. Za razliku od njih antigeni Rh, Duffy, Kell, Kidd i Lutheran ne nalaze se na trombocitima.

Na površini trombocita prisutni su molekuli glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC), tačnije samo antigeni klase I humanih leukocitnih antigena (engl. Human Leukocyte Antigen-HLA) HLA-A, HLA-B, HLA-C. Iako su nalaze u sličnim količinama kao HLA-A i HLA-B, antigeni HLA-C u većini slučajeva nemaju klinički značaj. U celoj krvi više HLA antigena potiče od trombocita nego od leukocita (4).

Zahvaljujući brojnim receptorima na površini trombociti imaju funkciju sekundarnih antigen-prezentujućih ćelija. Na svakom trombocitu nalazi se 80 000-120 000 molekula MHC klase I teških lanaca. Ovi molekuli bivaju rascepljeni od strane drugih ćelija, adsorbovani u sopstvenu unutrašnjost, u citoplazmu a potom eksprimirani kao denaturisani ponovo na površini trombocita ili se otpuštaju kao solubilni molekuli MHC klase I u cirkulaciju. I jedni i drugi HLA molekuli zajedno sa HPA antigenima mogu indukovati stvaranje aloimunih antitela, ali HLA molekuli ne mogu indukovati aktivnost citotoksičnih T limfocita (CTL) dok HPA mogu. Posledica otpuštanja solubilnih molekula HLA klase I tokom skladištenja trombocitnih komponenti pre upotrebe nisu poznate. Nemogućnost indukcije CTL je iskorištena za primenu donorskih imunomodulatornih transfuzija kod transplantiranih bolesnika sa ciljem produženja preživljavanja alografta (2,4,5).

U citoplazmi trombocita nalaze se organele, sadržaj trombocitnih granula prikazan je u Tabeli 2:

Tabela 2. Sadržaj trombocitnih granula

<i>Gusta tela</i>	<i>Alpha granule</i>		<i>Lizozimi</i>	<i>Mitohondrije</i>
<i>Nukleotidi</i> ADP, ATP, GDP, GTP	<i>Faktori inhibitori koagulacije</i> Fibrinogen, Protein S FV, plazminogen FVII, FXI, FXIII	<i>-Hemokini</i> CCL5 CCL3 CXCL7 CXCL5 CXCL11	<i>-Kisele proteaze</i> Katepsin D, E Karboksiptidaze Kolagenaze Kisela fosfataza Arilsulfataze	<i>Peroksizomi</i>
<i>Amini</i> Serotonin Histamin	<i>Adhezivni GP</i> Fibronektin Vitronektin vWF			
<i>Bivalentni kationi</i> kalcijum magnezijum	<i>Proteazni inhibitori</i> a ₂ - makroglobulin, a ₂ -antitripsin a ₂ -antiplazmin PAI1, TFPI, C1 inhibitor	<i>Proteoglikani</i> β TG, PF4 Serglicin	<i>-Glikohidrolaze</i> Heparinaza b -glukuronidaze, b -galaktozidaze a -L-fukosidaze glicerofosfataze b-N-acetil- glukozaminidaze -L-arabinozidaze, -D-manozidaza	
	<i>Celularni mitogeni</i> trombocitni faktor rasta (PDGF) TGF-β, IL β	Albumin, IgM, IgG, IgA		

Invaginacijom plazmatske membrane trombocita nastaje *otvoreni kanalikularni sistem* (OKS) koji čini kompleksnu mrežu uvijenih membranskih tubula koji prožimaju citoplazmu. Kroz OKS plazmatske supstance ulaze u trombocit a produkti sekrecije izlaze (6).

Zahvaljujući određenoj količini zadržane mRNA tokom njihovog formiranja iz megakarocita, trombociti ne predstavljaju samo skladište bioaktivnih medijatora nego poseduju kapacitet da sami vrše sintezu molekula. Tokom aktivacije sekretuju više od

300 različitih proteina: hemokine, citokine, interleukine, faktore rasta, antibakterijske peptide, adhezivne proteine, kostimulatorne i aktivirajuće faktore (7).

Vek trombocita

Vek trombocita je oko 10 dana. Oko 2/3 ($\sim 180 \times 10^9/l$) trombocita slobodno cirkuliše u krvi, a 1/3 ukupnog pula trombocita se normalno sekvstrira u jetri i slezini. Kad je broj trombocita u krvi manji od 50,000/ μl značajno se skraćuje životni vek trombocita.

Funkcije i interrekcije trombocita

Trombociti učestvuju u primarnoj fazi hemostaze formiranjem belog trombocitnog tromba kao i u sekundarnoj fazi, aktiviranjem koagulacionog sistema. Funkcije trombocita u hemostazi navedene su tabelarno (Tabela 3.)

Tabela 3. Funkcije trombocita u hemostazi

<i>Održavanje vaskularnog integriteta</i>	Pomažu u ispunjavanju rupa u endotelijalnom prostoru. Za ovu funkciju potrebno je oko 7100 trombocita/ μl /dnevno.
<i>Uloga u započinjanju koagulacije</i>	Formiranje trombocitnog ugruška na površini rane je prvi korak u koagulacijskom putu.
<i>Adhezija</i>	U normalnim uslovima trombociti se ne lepe za endotel. U slučaju oštećenja endotelijalne površine von Willebrand factor (vWF) se veže za subedotelni kolagen a zatim se veže za trombocitni receptor GPIb/IX, tom interrekcijom trombociti se aktiviraju.
<i>Aktivacija</i>	Dovodi do otpuštanja dodatnog vWF i fibrinogena iz alpha granula, kao i serotonina i ADPa iz gustih tela.
<i>Agregacija</i>	Trombociti menjaju oblik, prelaze iz diskoidnog u oblik pauka sa prominentnim pseudopodama za interrekciju sa drugim trombocitima na oštećenim površinama krvnih sudova

<i>Aktiviranje koagulacione kaskade</i>	Povećanjem ekspresije GP IIb/IIIa (na površini trombocita) dolazi do vezivanja fibrinogena i stvaranja mostova između trombocita, što rezultira u stvaranju i formiranju fibrinskog ugruška. Sekretijom dodatnog tromboksana A ₂ iz aktiviranih trombocita regrutuju se drugi trombociti i indukuje se vazokonstrikcija krvnog suda.
---	---

Funkcija hemostaze regulisana je kompleksnim interrekcijama koje uključuju različite molekule: selektine, integrine, lipide i citokine.

Aktivirani trombociti osim međusobno, interreaguju sa različitim populacijama ćelija (neutrofilima, endotelnim ćelijama, dendritičnim ćelijama) značajnim za imuni i inflamatorni odgovor domaćina i imaju ulogu medijatora celularne komunikacije.

Funkcija hemostaze regulisana je kompleksnim interrekcijama koje uključuju različite molekule: selektine, integrine, lipide i citokine (8).

Interrekcije između trombocita i imunog sistema

Trombociti ekspimiraju mnoge imunomodulatorne molekule: P - selektin, Toll like receptori (TLRs), CD40L i citokini IL1 β , TGF- β . Zahvaljujući njima mogu da reaguju sa različitim imunim ćelijama i da učestvuju u urođenom i stečenom imunitetu (generisanom funkcijom antigen specifičnih receptora). Koliko su značajni u hemostazi, isto toliko su trombociti značajni i za imunitet domaćina.

Trombociti kao deo urođenog imunog sistema

Trombociti učestvuju u održavanju imuniteta svojim interrekcijama sa virusima, bakterijama i parazitima. Interrekcija sa bakterijama indukuje aktivaciju trombocita i fagocitozu bakterija kao i sekreciju antimikrobnih peptida-trombocida. Trombociti sadrže mnoge proinflamatorne citokine, od kojih je trombocitni IL-1 aktivan u cerebrovaskularnoj inflamaciji. On indukuje otpuštanje hemokina CXCL1 iz

aktiviranih moždanih endotelnih ćelija, a IL-6 i IL8 iz vaskularnih glatkih mišićnih ćelija.

Takođe, trombociti eksprimiraju TLRs receptore: TLR-2, TLR-4, TLR-9 preko kojih reaguju sa lipopolisahardima (LPS) Gram negativnih bakterija. LPS aktiviraju trombocite i dovode do interrekcije trombocita i neutrofila. Aktivacijom i degranulacijom neutrofila dolazi do ubijanja bakterija. LPS stimulisana trombocitna sekrecija potencira trombocitnu agregaciju i formiranje tromba preko TLR-4 receptora. Tromboze u malim krvnim sudovima sprečavaju invaziju mikroorganizama i širenje septikemije i viremije.

Trombociti su kao proinflamatorne ćelije značajan deo urođenog imuniteta. Najnovije studije su pokazale da su primarne hronične autoimunske trombocitopenije povezane sa visokim dugotrajnim rizikom od infekcije (9).

Nasuprot proinflamatornim citokininima, trombociti sadže i anti-inflamatorne citokine, kao što je transformirajući faktor rasta (*Transforming faktor rasta* - TGF- β). TGF- β je potentan imunosupresivni faktor. Metastazirajuće tumorske ćelje indukuju trombocite da sekretuju TGF- β koji potom inhibira antitumorsku aktivnost ćelija prirodnih ubica (NK ćelija). Neutralizacija sekretovanog TGF- β iz trombocita dovodi do obnove antitumorske aktivnosti u organizmu.

Trombospondin I (TSP-1) koji čini 25% proteinskog sadržaja α granula trombocita, aktivira anti-inflamatorni citokin TGF- β i inhibira fagocitni kapacitet makrofaga. On je povezan sa insuficijencijom organa izazvanom sepsom. Na taj način trombociti nisu samo proinflamatorne ćelije nego su modulatori balansa između inflamacije i imunog odgovora.

Trombociti takođe sadrže stimulatore angiogeneze, kao što su vaskularni endotelni faktor rasta VEGF, angiopoietin, PDGF, i insulin-like GF i inhibitore angiogeneze (angiostatin, endosain, TSP-1, PF4). Smešteni su u α granulama a njihovo otpuštanje zavisi od puta aktivacije trombocita i lokalnog inflamatornog statusa. Do angiogeneze dolazi u okviru inflamatornog odgovora. Novoformirani krvni sudovi transportuju inflamatorne ćelije i pojačavaju proliferaciju inflamiranog tkiva.

Trombociti sadrže mnoge hemokine. Hemokin PF4 odgovoran je za diferencijaciju monocita u makrofage. Otpuštanje hemokina regrutuje neutrofile na mesto infekcije kao odgovor na invaziju mikroorganizama kroz trombocitne receptore (TLRs) (10).

Dodatni način kojim trombociti potiču urođeni imunitet je ispoljavanje liganda aktivirajućeg receptora koji se eksprimira na plazma membrani mijeloidnih ćelija, *triggering receptor expressed on myeloid cells* (TREM1) tokom njihove aktivacije. TREM1 pripada superfamiliji imunoglobulina, takođe se eksprimira na neutrofilima i monocitima. Njegova aktivacija dovodi do efektornog granulocitnog odgovora, fagocitoze i otpuštanja IL-8. TREM receptor sistem suprimira potencijalno štetan trombocitima indukovani inflamatorni odgovor u sepsi.

Trombociti kao deo adaptivnog imunog sistema

Nakon trombocitne aktivacije P selektin se translocira iz α granula na površinu gde igra važnu ulogu u razvoju Th-1 imunog odgovora. Istovremeno on reaguje sa ćelijama endotela venula preko adresina perifernog ćvora (PNAd) i preko P-selektin glikoprotein liganda -1 (PSGL-1) sa limfocitima. Fibrinogen koji je ključan za koagulaciju i trombocitnu agregaciju preko $\beta 3$ integrina daje signal trombocitima za *de novo* sintezu P-selektina, čime se održava stalan sadržaj P-selektina u trombocitima. Time je uspostavljena sprega između sistema koagulacije/hemostaze sa sistemom inflamacije/imunog odgovora (11).

Kao odgovor na aktivaciju, pored P selektina trombociti ekspimiraju i CD40 ligand ili po drugoj nomenklaturi CD154. On igra važnu ulogu u promeni klase imunoglobulina (*Ig switch*) i povećava CD8 T ćelijsku funkciju tokom virusne infekcije. Takođe direktno utiču na B ćelijsku diferencijaciju i proliferaciju a time i produkciju antitela. Na taj način trombociti moduliraju balans između imunske tolerancije, inflamacije i autoimunih oboljenja.

Aktivirani trombociti otpuštaju i solubilni CD154 koji interreaguje s vaskularnim i endotelnim ćelijama dovodeći do oslobađanja IL-6 i tkivnog faktora. Interreakcijom CD 40 i njegovog liganda CD154 podstiče se aktivacija monocita i dendritičnih ćelija, time se povećava prezentacija antigena T limfocitima i pojačava adaptivni imuni odgovor.

Solubilni CD154 prisutan u skladištenim koncentratima trombocita može dovesti do aktivacije plućnih neutrofila preko CD40, učestvujući u patogenezi ozbiljne transfuzijske reakcije sa transfuzijom povezanog akutnog oštećenja pluća (TRALI).

Poremećaji imuniteta su odgovorni za pojavu autoimmune trombocitopenije, sa infekcijom povezana trombocitopenije, fetalne i neonatalne aloimunske trombocitopenije, oboljenja u kojima su ciljne ćelije trombociti (12).

Metabolizam trombocita

Trombociti i ako nemaju jedro veoma su metabolički aktivni. Energiju koja je neophodna za promenu oblika i otpuštanje sadržaja granula i gustih tela trombociti obezbeđuju aerobnim i anaerobnim metabolizmom. Najbolji izvor adenozin trifosfata (ATP) je aerobni Krebsov ciklus oksidativne fosforilacije. Smanjenje snabdevanja kiseonikom dovodi do povećanog anaerobnog metabolizma (glikolize), sniženja pH, i sledstvene promene oblika trombocita (14).

Deficit trombocita

Trombocitopenije su poremećaji u kojima je broj cirkulirajućih trombocita nizak (ispod $150 \times 10^9/l$). Zavisno od uzroka trombocitopenije mogu biti genetske, povezane sa malignitetom ili imunološki posredovane. Razlikujemo autoimunske trombocitopenije kada je destrukcija trombocita uzrokovana sopstvenim antitelima (npr. imuna trombocitopenija - ITP gde su antitela porekla CD 19 B limfocita) i aloimunske, kada postoje anti-trombocitna aloantitela protiv transfundovanih trombocita, kao što su refraktornost na transfuzije trombocita, posttransfuzijska purpura ili fetalna/neonatalna aloimuna trombocitopenija-FNAIT.

Trombocitopenije povezane s infekcijom (virusne infekcije – HIV i HCV, *Helicobacter pylori*) i indukovane upotrebom lekova npr. cefalosporinima, pripadaju grupi trombocitopenija gde su destrukcija trombocita i inhibicija megakariocita izazvane citotoksičnim T limfocitima (CD8).

Trombocitopenijska krvarenja su tipično mukokutana (petehije, epistaxisa, i dr). Smanjen broj trombocita ili poremećaj njihove funkcije takođe mogu dovesti do hirurškog krvavljenja i životno ugrožavajućih intrakranijalnih krvarenja (13).

II INDIKACIJE ZA PRIMENU TROMBOCITA KOD DECE

Trombocitne komponente najviše se primenjuju u pedijatrijskoj hematoonkologiji posle transplantacije matičnih ćelija hematopoeze i u zbrinjavanju životno ugroženih bolesnika sa DIKom ili sindrom masivne transfuzije (15,16,17,18).

Pored bolesnika koji primaju transfuzije trombocita terapijski zbog krvarenja, sve je veći broj onih koji ih primaju preventivno, da se spreči krvarenje u slučaju hipoproliferativne trombocitopenije (19,20,21). Na osnovu kliničkih aspekata bolesnici sa hematološkim i onkološkim oboljenjima mogu se svrstati u četiri grupe, kao što je prikazano u Tabeli 4. (22).

Tabela br 4. Indikacije za terapiju trombocitima kod hemato-okoloških bolesnika

Bolesnici	Terapija trombocitnim produktima
sa hroničnom trombocitopenijom zbog smanjene produkcije trombocita (aplastična anemija, MDS)	profilaksno na br <5000/ μ l a < 10 000/ μ ml pri prethodnom krvarenju ili febrilnosti većoj od 38°C
sa povećanom potrošnjom trombocita (imunske trombocitopenije, sepsa, DIK)	samo u slučajevima teških hemoragija
sa oštećenom produkcijom trombocita zbog hemioterapije	-akutne leukemije kod manifestnog krvarenja i profilaksno na < 10 000/ μ ml -posle BMT bez komplikacija (GVHD, mukozitis, cistitis) < 10 000/ μ ml -solidni tumori bez dodatnih faktora rizika za krvarenje < 10 000/ μ ml
sa smanjenom produkcijom trombocita i dodatnim faktorima rizika za krvarenja (infekcija, T >od 38°C, leukocitoza, petehijalna krvarenja, koagulacijski poremaćaji sa sklonosti krvarenju, nagli pad broja tr; postojanje nekrotičnih područja, oštećenje jetre)	profilaksno na < 20 000/ μ ml

Transfuzija trombocita kod bolesnika sa disfunkcionalnim trombocitima

Bolesnici sa kongenitalnim trombocitopatijama (Glanzman, Bernard-Soulier) imaju epizode profuznih krvarenja jer razvijaju izoantitela na proteine trombocita koji im nedostaju, te su praktično refrakterni na sve trombocite. Izbegava se ekspozicija krvnim komponentama i primenjuje DDAVP. Kod stečenih trombocitopatija (hronična insuficijencija bubrega, lekovi) transfuzije trombocita se ne daju profilaktički već samo

pri aktivnom krvarenju. Kod imunih trombocitopenija terapija su intravenski IgG imunoglobulini (IVIG) i kortikosteroidi (23,24).

Primena trombocita u pripremi za hirururške intervencije i medicinske procedure i tokom krvarenja prikazana je tabelarno, Tabela 5.(25).

Tabela br 5. Primena trombocita kod medicinskih procedura i krvarenja

Vrsta procedure	Vrednost broja trombocita u periferiji pri kojem se započinje terapija trombocitnim produktima
Lumbalna punkcija	Neposredno pre procedure/intervencije ako je broj trombocita <50 000/ μ l
Kod ekstrakcije zuba, gastrointestinalne endoskopije, aspiracije zgloba, bronhoskopije i transbronhalne biopsije, angiografije, insercije CVK	na <20 000/ μ l trombocita
Kardiohirurgija	<20 000/ μ l trombocita
Pre CNS i retinalnih procedura	<100 000/ μ l trombocita
Spinalna anestezija	<50 000/ μ l trombocita
Epiduralna anestezija	<80 000/ μ l trombocita
Kod krvarenja	na <50 000/ μ l trombocita
Životno ugrožavajuća krvarenja	<100 000/ μ l trombocita

Standardna terapijska doza trombocita za odrasle osobe priprema se iz 4–6 jedinica krvi, primenjuje se jedna jedinica trombocita na 10 kg telesne mase (tm). Kod pedijatrijskih bolesnika primenjuje se jedna jedinica trombocita na 5 kg telesne mase. Doziranje trombocitnih produkata za decu telesne mase do 15 kilograma, je 10-15 ml /kg tm, za više od 15 kg doza je kao za odrasle (26).

Postoje oboljenja kod kojih je transfuzija trombocita kontraindikovana: Trombotična trombocitopenijska purpura (TTP), Heparinom indukovana trombocitopenia (HIT), Post-transfuziona purpura (PTP) i Hemolizno uremijski sindrom (24).

III. TROMBOCITNI PRODUKTI

Kolekcija, procesiranje, modifikacije i čuvanje

Trombociti dobijeni iz doza cele krvi

Trombociti dobijeni iz davanja pojedinačne doze cele krvi, predstavljaju 1/6 potrebne doze za pacijenta. To su random donor trombociti. Metoda dobijanja trombocita su iz: plazme bogate trombocitima (PRP) ili iz *buffy coat*-a (BC – trombocitno-leukocitni sloj). Zapremina koncentrata trombocita pripremljenog iz jedinice cele krvi je oko 50–75 ml i on sadrži približno $0.50\text{--}0.70 \times 10^{11}$ trombocita (27, 28).

Trombociti dobijeni aferezom

Koncentrati trombocita mogu se dobiti i trombocitafereznom procedurom pomoću automatskog separatora krvnih ćelija, čime se smanjuje rizik aloimunizacije i prenosa virusne infekcije. Aferezni trombociti sadrže oko $2\text{--}4 \times 10^{11}$ trombocita resuspendovanih u plazmi (oko 250 ml) što predstavlja standardnu terapijsku dozu trombocita za odrasle (29,30).

Trombociti dobijeni puliranjem

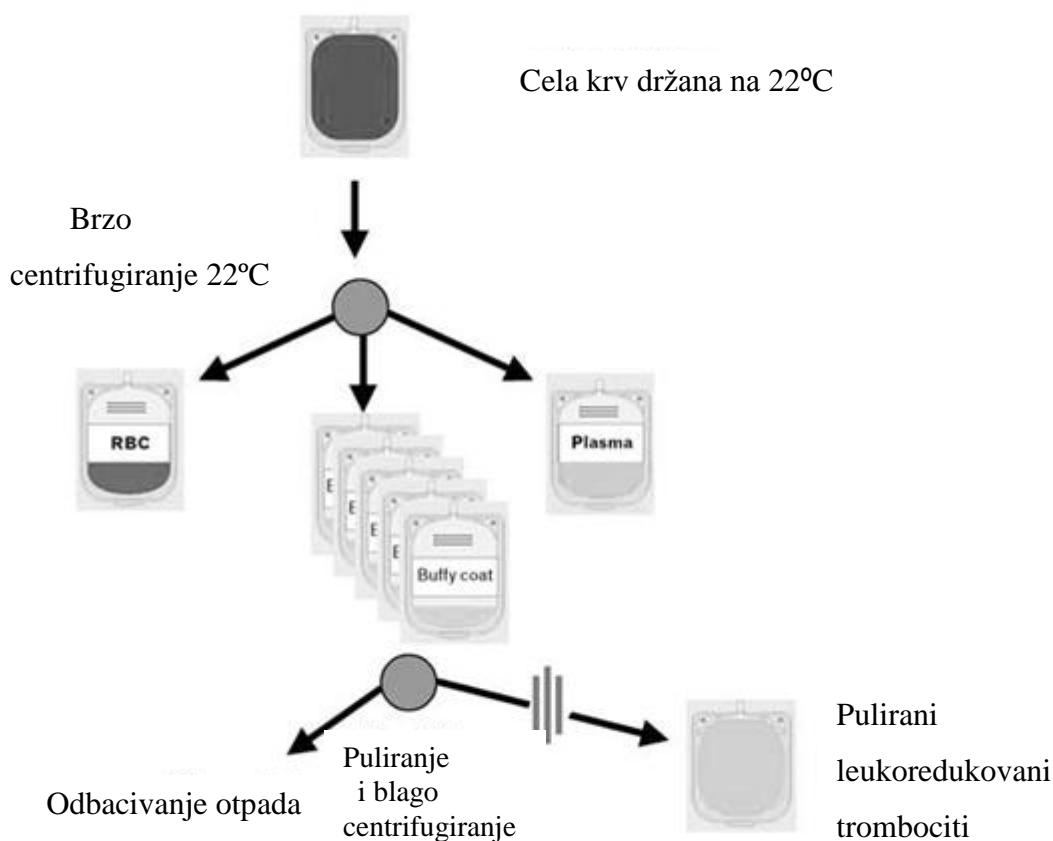
Pulirani koncentrat trombocita se najčešće priprema puliranjem nekoliko jedinica BC trombocita iste ABO krvne grupe. Više koncentrata trombocita pre centrifugiranja se sjedini u jednu kesu a dilucija pula vrši se plazmom. Postoje dve metode puliranja BC: korišćenjem komercijalnih kitova ili lančanom metodom (za *top and bottom* kese). Volumen pula trombocita je 200 ml a sadržaj trombocita $\geq 3 \times 10^{11}$ (13) Proizvodnja i puliranje trombocita prikazani su na slici br 1. (31).

Trombociti u aditivnom rastvoru za trombocite

Puliranjem nekoliko jedinica koncentrata trombocita iste ABO krvne grupe pre centrifugiranja BC se sjedine u jednu kesu, dilucija pula se vrši aditivnim rastvorom za trombocite (PAS). Primena aditivnih rastvora za čuvanje trombocita (PAS) produžava rok skladištenja koncentrata na 7 dana i pokazuje brojne prednosti u odnosu na plazmu. Smanjena je koncentracija proteina plazme u koncentratu trombocita koja može da bude uzrok posttransfuzijskih alergijskih i febrilnih reakcija, veća je mogućnost primene ABO-inkompatibilnih transfuzija trombocita, a takođe je veća količina plazme

dostupne za frakcionisanje. Kvalitet trombocitnih koncentrata dobro je očuvan, što se ogleda kroz inhibiciju ili smanjenje stepena aktivacije trombocita tokom kolekcije, procesiranja krvi i skladištenja trombocitnih koncentrata. Nivo glikolitičke aktivnosti, anaerobne potrošnje glukoze i produkcije laktata, je minimalan, a određena koncentracija glukoze održava se u trombocitnim koncentratima tokom celog perioda skladištenja. Postoje tri generacije aditivnih solucija za trombocite: PAS I, PAS II (T-Sol, SSP), PAS III (InterSol) i modifikovani PAS III (SSP+) (32, 33).

Slika 1. Proizvodnja trombocita iz Buffy coata



Modifikovano iz Vassallo RR, Murphy S. A critical comparison of platelet preparation methods. *Current Opinion in Hematol.* 2006; 13:323–330. (31).

Trombociti se čuvaju u specijalnim plastičnim kesama propusnim za gasove, koje omogućavaju transport kiseonika na temperaturi $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, uz kontinuiranu agitaciju na horizontalnom agitatoru (približno 70 ciklusa u minutu), kako bi se sprečila agregacija

trombocita i ubrzao transfer kiseonika. Rok skladištenja koncentrata trombocita je pet do sedam dana. Redukcija broja leukocita u koncentratima trombocita postiže se korišćenjem filtera za uklanjanje leukocita, čime se smanjuje učestalost posttransfuzijskih reakcija i prevenira transmisija intracelularnih patogena kao što je citomegalo virus (CMV). Leukociti prisutni u koncentratima trombocita, tokom skladištenja, mogu dovesti do strukturnih promena trombocita, a time i do funkcionalnih poremećaja (smanjena agregabilnost), uprkos normalnim vrednostima njihovog in vivo oporavka i preživljavanja (34).

U kontroli kvaliteta doza trombocita procenjuje se morfologija, promena oblika, površinski markeri, stvaranje mikroagregata, otpuštanje mikropartikula i metabolički proizvodi trombocita PF4, β TG, LDH, intracelularni nivo ATP, mitohondrijalni markeri i odgovor na hipotonični šok (35). Pojava glikolize pokušava se izbeći novim rastvorima za čuvanje i kesama za uzimanje trombocita (32). Bezbednost transfuzije trombocita značajno se povećava inaktivacijom patogena delovanjem amotosalena ili riboflavina uz dodatno izlaganje koncentrata trombocita UV zračenju (36).

IV EFEKTIVNOST TRANSFUZIJA TROMBOCITA

Primena trombocita, bilo terapijski ili preventivno, može biti praćena neadekvatnim porastom broja trombocita u cirkulaciji zbog refraktornosti.

Procena bolesnikovog odgovora na transfuziju trombocita vrši se određivanjem broja trombocita 1h i 24h od transfuzije trombocita, izračunavanjem porasta korigovanog broja trombocita (KBT) i procenta oporavka trombocita. Prema podacima iz literature samo oko 50% primenjenih transfuzija standardnih koncentrata trombocita ima zadovoljavajući posttransfuzioni porast broja, 32% ima nedovoljan porast broja trombocita, a 18% ima granične vrednosti (37,38,39).

Refraktornost na transfuzije trombocita

Kod bolesnika koji primaju ponavljane transfuzije trombocita može doći do aloimunizacije na antigene leukocita i/ili trombocita koje bolesnik nema na svojim ćelijama. Prisutna aloantitela u cirkulaciji dovode do imunološki posredovane

fagocitoze primljenih donorskih trombocita, što dovodi do refraktornosti na date doze trombocita (2,4,5,7).

Refraktornost na transfuzije trombocita može biti imunog ili ne imunog porekla, kao što je prikazano u tabeli br 6. (40).

Tabela 6. Faktori koji utiču na efikasnost transfuzija trombocita

Klinički faktori vezani za bolesnika		Faktori od strane koncentrata trombocita
Uzroci ne imunske refrakternosti	Uzroci imunske refrakternosti	
prisustvo infekcije (lokalne ili sistemske),	aloantigeni krvnogrupnih sistema: ABO, P, Ii, Lewis	doza trombocita
febrilnost	antigeni klase I HLA	medijum za čuvanje (plazma ili PAS)
primena lekova koji utiču na efekat primenjenih doza trombocita (amfotericin B, vankomicin, heparin)	antigeni trombocita HPA	vreme skladištenja
endotelna i mukozalna oštećenja		ABO kompatibilnost
ponavljana krvarenja		Amplitude ROTEMA

HPA specifični humani trombocitni antigeni, HLA humanih leukocini antigeni PAS trombocitni aditivni rastvor.

Najčešći imuni razlog refraktornosti na transfuzije trombocita je prisustvo imunih aloantitela na antigene HLA klase I. Kod 1/3 obolelih od akutnih leukemija i aplastične anemije, koji su zbog prisutnih anti-HLA antitela dobijali HLA kompatibilne tipizirane doze koncentrata trombocita, posttransfuzioni porast broja trombocita je bio neadekvatan zbog stvaranja specifičnih antitrombocitnih antitela. Bolesnik može imati anti-HLA ili anti-trombocitna antitela, ili oba istovremeno (41,42).

U serološkoj studiji Kiefela i saradnika anti-HLA antitela su nađena kod 42.9% politransfundovanih pacijenata. Za trombocitne antigene specifična antitela nađena su kod 13.9% ovih bolesnika, a 8% imalo je samo antitela za specifične trombocitne

antigene. U populaciji hematoonkoloških adultnih bolesnika anti-trombocitna antitela imala su sledeću specifičnost HPA-5b, HPA-1b, HPA-2b, HPA-1a (43).

Primena podudarnih doza trombocita ne isključuje pojavu transfuzijskih reakcija tokom i posle davanja standardnih trombocitnih koncentrata ili afereznih produkata trombocita (44,45).

Pojava i rizici za Rh (D) aloimunizaciju nakon primene Rh (D) + transfuzija trombocita

Rh antigeni nisu prisuti na površini trombocita ali koncentradi trombocita mogu da sadrže količinu eritrocita dovoljnu da izazove imunizaciju. Incidenca RhD aloimunizacije trombocitnim transfuzijama je prema literaturnim podacima od 0-18.7%. Za nastanak aloimunizacije značajniji su količina eritrocita u trombocitnom produktu i stepen imunosupresije primaoca. Za postavljanje dijagnoze Rh (D) aloimunizacije na transfuzije trmbocita neophodno je isključiti moguću prethodnu imunizaciju kod žena izazvanu trudnoćama ili raniju imunizaciju drugom krvnom komponentom primenjenom tokom života (46).

Količina eritrocita u trombocitnom produktu

Minimalna doza eritrocita koja može izazvati primarnu RhD aloimunizaciju je 0.03 ml. Koncentradi trombocita sadrže mikropartikule eritrocita i delove ćelijske membrane eritrocita veličine 0.1-1 μ m. Ukoliko je koncentrat trombocita pripremljen iz krvi RhD pozitivne osobe, mikropartikule eritrocita eksprimuju RhD antigen na svojoj površini. Volumen eritrocita po koncentratu trombocita iz BC je 0.42 ml a u pulu trombocita 0.59 ml. Poboľšanjem afereznih tehnologija i procesiranja krvnih komponenti smanjena je eritocitna kontaminacija u trombocitnim komponentama. Volumen eritrocita u afereznim trombocitima je 0.00043 ml a u leukoredukovanim puliranim koncentratima trombocita u aditivnom rastvoru 0.036 ml.

Aferezni trombociti sadrže 0.0001-0.001 ml mikropartikula eritrocita za koje je dokazano da mogu biti imunogenije od očuvanih eritrocita jer lako mogu biti fagocitovane od strane primaočevih antigen prezentujućih ćelija (47).

Najveći rizik za aloimunizaciju imaju trombociti pripremljeni iz plazme bogate trombocitima, zatim iz buffy coat-a, a najmanji aferezni trombociti (48).

Stepen imunosupresije primaoca

Kod imunokompetentnih bolesnika-primalaca RhD inkompatibilnih transfuzija trombocita imuni odgovor u vidu produkcije anti-D antitela dešava se kod 21%, najčešće između 1-5 meseci (u proseku tri meseca). Kod imunosuprimiranih bolesnika (HIV, transplantacije solidnih organa i hematopoetskih matčnih ćelija) produkcija anti-D antitela dešava se kod 7.5%. Zbog toga se govori o protektivnom efektu imunosupresije na aloimunizaciju (48).

Isključivanje sekundarne aloimunizacije

Zbog ranijih transfuzija ili trudnoće. Primarna imunizacija RhD negativnih osoba dešava se 4-10 nedelja po dobijanju RhD pozitivnih trombocita, i definiše se pojavom anti-D antitela ≥ 28 dana od prve transfuzije RhD+ trombocita. Neophodno je dovoljno dugo praćenje bolesnika da se utvrdi primarna imunizacija. Za razliku od primarnog, u sekundarnom imunom odgovoru aloanti-D antitela pojavljuju se unutar 27 dana od transfuzije RhD pozitivnih trombocita zbog anamnestičkog imunog odgovora (48).

Utvrđeno je da je stepen senzibilizacije veći kod bolesnika koji su imali febrilnu ne hemoliznu transfuzijsku reakciju (FNHTR) i da je inflamacija primaoca povezana s porastom aloimunizacije što podržava koncept da inflamacija menja imuni odgovor. Suprotno sklonosti ka aloimunizaciji zbog imunog i inflamatornog statusa primaoca, određeni broj RhD negativnih pacijenata (20-30%) nikada ne stvori anti-D antitelo bez obzira na broj primljenih RhD pozitivnih doza trombocita. Radi se o neresponderima, što je genetski determinisana karakteristika (49).

Prevenција (RhD) - aloimunizacije nakon transfuzija RhD+ trombocita

Prevenција primarne RhD imunizacije sprovodi sa 20 μ g RhD imunoglobulina po mililitru RhD+ eritrocita. U upotrebi je RhIgG, 120 μ g (600IJ) za intravenoznu primenu (i.v.). Ova doza i.v. RhIgG adekvatna je za prevenciju RhD aloimunizacije nakon primene puna ili doze afereznih RhD pozitivnih trombocita. Mogući neželjeni efekti i.v. primene RhIgG su pireksija i hemoglobinurija (48).

Zbog niskog stepena senzibilizacije kod imunosuprimiranih pacijenata koji isključivo primaju aferezne trombocite raspravlja se o bezbednosti davanja RhD pozitivnih doza trombocita bez primene RhD imunoprofilakse (49,50).

Internacionalnom studijom Aloimunizacija nakon D-inkompatibilnih transfuzija trombocita, (*Alloimmunization after D-incompatible Platelet Transfusions*) - ADAPT)

utvrđena je niska frekvencija 1.4% primarne RhD aloimunizacije, koju treba uzeti u obzir pre definitivne odluke o uvođenju profilakse Rh Imunim Globulinom D kod muškaraca i žena koje su van reproduktivnog perioda (51).

Za pedijatrijsku populaciju nije utvrđena minimalna doza eritrocitne kontaminacije trombocitnih komponenti koja dovodi do imunizacije, preporučuje se i nadalje imunoprofilaksa sa Rh (D) IgG (52).

V PODNOŠLJIVOST TRANSFUZIJA TROMBOCITA

Transfuzijske reakcije

Transfuzija krvi je jedna vrsta transplantacije jer se direktno u cirkulaciju primaoca unosi tkivo druge osobe sa ciljem nadoknade funkcije određene vrste ćelija, odnosno plazme. Imajući u vidu činjenicu da se pre transfuzije sprovodi ograničeni obim ispitivanja davalaca i primaoca, za očekivati je da značajan broj primalaca ispolji nepodnošljivost na transfuzije krvnih komponenti, pa i na transfuzije trombocita. Rizik od nepodnošljivosti raste sa povećanjem broja transfuzija. U transfuzijskoj nauci i praksi uobičajeno je da se nepodnošljivost iskazuje transfuzijskim reakcijama i komplikacijama (53).

Transfuzijske reakcije pripadaju grupi neželjenih događaja na čiju pojavu i učestalost utiču karakteristike krvnog produkta (broj doza, tip-aferezni trombociti ili od pojedinačnog donora, dužina skladištenja, ABO krvnogrupa podudarnost sa primaocem) i karakteristike bolesnika - primaoca (pol, starost, vrsta hemoterapije i transplantacije (54,55,56).

Transfuzijske reakcije prema vremenu javljanja mogu biti rane (akutne) ili kasne. Rane se javljaju u prvih 24 sata od primene transfuzije, akasne posle 24 sata od primene transfuzije. Od svih transfuzijskih reakcija rane čine 0,5-3% (57). Vrste transfuzijskih reakcija prema vremenu ispoljavanja date su u tabeli 7 (58, 59).

Tabela 7. Transfuzijske reakcije

Transfuzijske reakcije	
Akutne - rane do 24h od transfuzije	Odložene-kasne nakon 24h od transfuzije
-Transfuzijom uzrokovano akutno oštećenje pluća (Transfusion-related acute lung injury - TRALI)	Post transfuzijska purpura (PTP)
- S transfuzijom povezano preopterećenje cirkulacije (TACO–Transfusion associated circulatory overload)	S transfuzijom povezana bolest kalema protiv domaćina (Transfusion-associated GVHD)
- febrilne ne hemolizne transfuzijske reakcije (FNHTR)	Aloimunizacija
-alergijske reakcije	Imunomodulacija-imunosupresija
- septikemija	Hemosideroza
Akutna hemolizna transfuzijske reakcije (AHTR)	Kasna hemolizna transfuzijska reakcija (KHTR)

Najčešće transfuzijske reakcije su alergijske i febrilne ne hemolizne transfuzijske reakcije (FNHTR). Prema težini kliničke slike mogu biti blage, umerene i teške (60).

Hemolizne transfuzijske reakcije

Hemolizne transfuzijske reakcije pri primeni trombocita (HTR) - veoma su retke (1:2000 do 1:9000 transfuzija trombocita) zbog kapaciteta organizma da diluira pasivno unešena inkompatibilna anti-A i anti-B antitela. Ove reakcije dešavaju se u slučajevima minor ABO inkompatibilnosti, kada se trombociti krvne grupe O primene primaocu krvne grupe A, B, AB (zbog visokog titra anti-A izohemaglutinina), dok major ABO inkompatibilija vodi ubrzanjoj destrukciji trombocita (61). U engleskom sistemu praćenja neželjenih efekata transfuzija (hemovigilanca) HTR na trombocite čine 20% svih HTR, odnosno 33% svih HTR kod dece. Kod dece uzrasta od 8 meseci do 18 godina opisane su HTR na veoma male količine inkompatibilne plazme (20ml) sa pojavom diseminovane intravaskularne koagulacije (DIK), anurije i multi – organske insuficijencije i letalnim ishodom (62, 63).

Faktori koji doprinose nastanku HTR nakon primene ABO inkompatibilne transfuzije trombocita su: ukupni volumen infundovane inkompatibilne plazme, vrsta inkompatibilnosti i pedijatrijski uzrast bolesnika zbog malog ukupnog krvnog volumena. U slučaju brojnih i ponavljanih transfuzija inkompatibilne plazme dolazi do porasta titra izohemaglutinina primaoca sa skraćanjem preživljavanja inkompatibilnih trombocita (64).

Za decu uzrasta do 18 godina, sa telesnom masom do 40 kg, i kod pacijenata sa malignim oboljenjima primenjuje se strategija isključivo ABO grupno identičnih trombocitnih komponenti, zbog velike senzibilnosti i rizika za imunu hemolizu (64).

Za ugentene, hirurške bolesnike dozvoljena je upotreba ABO grupno inkompatibilnih trombocita u volumenu do 600ml plazme za 24h ili 350ml/po produktu. Bolesnici koji su dobili ABO inkompatibilne alogene hematopoetske matične ćelije ne smeju primiti više od 50 ml inkompatibilne plazme u afereznim trombocitima (65). Dečiji bolesnici lečeni transplantacijom trebaju primiti ABO identične trombocite jer nekompatibilna plazma, naročito kod prethodno primenjenog terapijskog protokola sa busulfanom povećava rizik za nastanak hepatične veno-okluzivne bolesti nakon transplantacije (66).

Za prevenciju imunske hemolize, u nedostatku istogrupnih trombocita treba izbegavati O trombocite, a primenjivati trombocite krvnih grupa A ili B. Takođe, pre primene ABO inkompatibilnih afereznih trombocita treba uraditi hemolizine i titar aglutinina anti-A i/ili anti-B. Nema jedinstvenog stava o vrednost rizičnog titra izohemaglutinina (po nekim literaturnim izvorima za IgM klasu ≥ 64 za IgG klasu ≥ 256), dok hemolizini ne smeju biti prisutni (67,68,69).

U Velikoj Britaniji rutinski se za sve donore trombocita krvne grupe O radi titar izohemaglutinina i kao graničnu vrednost uzima titar 128. Za vrednosti titra više od 128 trombocitni produkt dobija oznaku visokog rizika "opasni donor krvne grupe O" (10-20% svih donora) i može se primeniti samo osobama krvne grupe O (70).

Pre primene ABO inkompatibilnih trombocita neophodno je redukovati inkompatibilnu plazmu u trombocitnom produktu, zamenom sa aditivnim rastvorom za trombocite ili plazmom AB krvne grupe, ili oprati trombocite i resuspendovati ih u fiziološkom rastvoru (65,71, 72).

Primećeno je da primena pula trombocita nosi manji rizik za HTR, jer dolazi do dilucije jedinice s visokim titrom izohemaglutinina sa drugim jedinicama trombocita koje formiraju pul, te je prosečna vrednost titra izohemaglutinina niža (73,74).

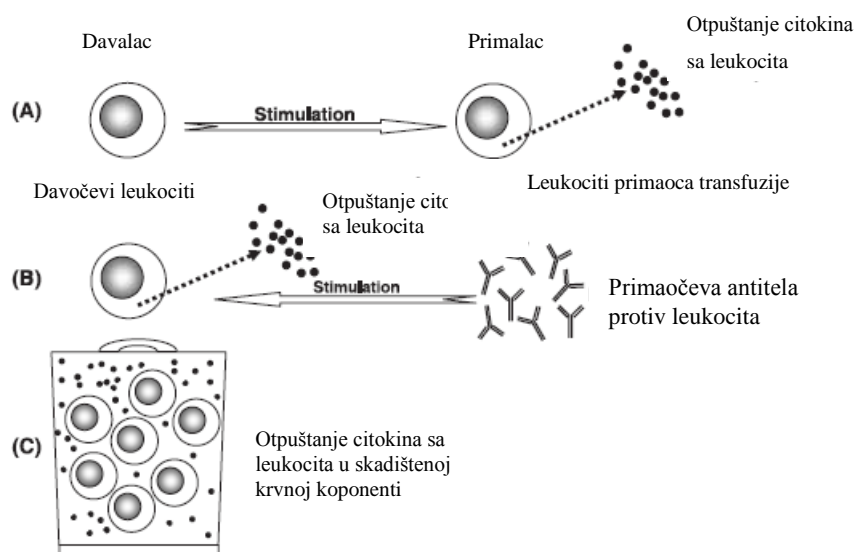
Febrilne nehemolizne transfuzijske reakcije - FNHTR

Febrilne nehemolizne transfuzijske reakcije (FNHTR) su česte, javljaju se kod 38% primalaca transfuzija trombocita. U epidemiološkoj studiji Oakley-a u dečijoj populaciji FNHTR čini 60% svih transfuzijskih reakcija (75). Incidenca varira zavisno od tipa trombocitnog produkta ali je značajno viša kod neleukoredukovanih (2.2%) nasparam leukoredukovanih produkata nakon skladištenja 0.4%. (54) Incidenca za eritrocitne komponente je oko 1:526, a za trombocitne oko 1:900 (76). U studiji Karima incidence FNHTR za eritrocite je 0.08% a za trombocite 0.004% (77).

U blagim oblicima FNHTR temperature je $\geq 38^{\circ}\text{C}$, ili između $1-2^{\circ}\text{C}$ od pretransfuzijske vrednosti, ali nema dugih znakova ili simptoma bolesti. U umereno teškim FNHTR pored povišene temperature za 2 ili više $^{\circ}\text{C}$ prisutni su i inflamatorni znaci, mijalgija ili mučnina a u teškim FNHTR znaci i trajanje febrilnosti značajno produžavaju dužinu hospitalizacije. FNHTR treba razlikovati od hemolizne i septične transfuzijske reakcije i akutnog oštećenje pluća povezanog s transfuzijom (57).

FNHTR mogu biti uzrokovane osim anti-leukocitnim (anti-HLA) antitelima i anti-trombocitnim antitelima (anti-HPA) a najređe secifičnim anti-granulocitnim antitelima primaoca. Svega oko 6% FNHTR na trombocitne produkte uzrokovano je antileukocitnim antitelima.

Primaočeva antitela i donorske ćelije - leukociti ili trombociti formiraju imunske komplekse koji stimulišu primaočeve makrofage da proizvode citokine (78). Takođe, FNHTR uzrokovane trombocitnim transfuzijama nastaju zbog akumulacije modifera biološkog odgovora (BMR) u plazmi tokom njihovog skladištenja. BRM su molekuli koji pripadaju grupi inflamatornih citokina, glikoproteina i hemokina koji se infunduju transfuzijom krvne komponente primaocu. Mehanizmi nastanka FNHTR prikazani su na Slici 2.



Modifikovano iz Lin JS, Tzeng CH, Hao TC, Hu HY, Ho YT, Lyou JY, et al. Cytokine release in febrile non-haemolytic red cell transfusion reactions. *Vox Sang* 2002; 82:156–160 (80).

Slika 2. Otpušanje citokina tokom čuvanja krvnih komponenti

Citokine proizvode leukociti ćelijskom lizom ili nastaju destrukcijom trombocita. BMR koje otpuštaju trombociti imaju različiti klinički značaj za primaoca: solubilni CD40 ligand je odgovoran za aktivaciju trombocita i FNHTR, RANTES za FNHTR i alergijske reakcije, a transformirajući faktor rasta (TGF- β 1) ima imunospresivni efekat (79).

Učestalost FNHTR značajno se smanjuje otklanjanjem plazme iz trombocitnog produkta kao i otklanjanjem leukocita i njihovim smanjenjem na manje od 5×10^8 ćelija po krvnom produktu. One FNHTR koje se ispolje posle deleukocitovanja i filtriranja po težini su blage ili umereno teške (80).

Kao mogući uzrok FNHTR Blumberg navodi 39-kDa CD40 ligand (CD40L), transmembranski glikoprotein čijim rascepljivanjem se oslobađa solubilni fragment sCD40L (81). Trombociti su najbogatiji izvor cirkulirajućeg sCD40L, koji indukuje ekspresiju ciklooksigenaze – 2, a time produkciju prostaglandina E2, glavnog medijatora febrilnosti u ljudi. sCD40L deluje i na monocite i makrofage da pojačaju produkciju IL-6, IL-8. Ovi interleukini i sami indukuju produkciju prostaglandina E2 (82, 83).

Nakon otklanjanja plazme zaostaju interleukini u tragovima, naročito IL-6 koji čak i u vrlo niskim koncentracijama može da izazove reakciju kod nekih pacijenata. Zbog

toga je potrebno izvršiti leukoredukciju pre čuvanja trombocita, čiji je benefit osim nižeg nivoa citokina, manja aktivacija trombocita i održavanje visokog nivoa pH u trombocitnom koncentratu tokom perioda skladištenja (84).

Stepen kontaminacije leukocitima zavisi od metode pripreme trombocita. Najveća kontaminacija leukocitima nalazi se u koncentratima trombocita pripremljenim iz plazme bogate trombocitima (platelet – rich plasma, PRP), zatim u koncentratima trombocita iz BC. Najmanji broj leukocita je u afereznim trombocitnim produktima ali on varira, zavisno od toga da li je produkt deleukocitovan filtriranjem ili ne. Rezidualni leukociti u trombocitnom koncentratu predominantno su limfociti a jednim delom monociti. Obe populacije ćelija produkuju IL-1, IL-6 i TNF- α . Tokom procesa proizvodnje trombocitnih komponenti dolazi do aktivacije monocita, što povećava koncentraciju citokina. Po unošenju u organizam, modifikatori biološkog odgovora uzrokuju brze reakcije pa se FNHTR ispoljava kod primaoca tokom ili neposredno po primanju trombocita. Odložene FNHTR nastaju posle vezivanja leukoaglutinina na ciljne leukocite. Pri tome se aktivira komplement ili imuni mehanizam inflamatornog odgovora koji dovodi do destrukcije obloženih leukocita. (85).

Povezanost FNHTR sa primenom ABO nepodudarnih trombocita pronađena je u studiji Henrichsa i Howka (86,87). Dolazi do stvaranja ABO imunih kompleksa između solubilni A i B antigena i odgovarajućih antitela primaoočeve plazme. Nastali ABO imuni kompleksi menjaju funkciju trombocita, okidač su aktivacije komplementa i inflamacije što vodi transfuzijskoj reakciji i aloimunizaciji. (88,89,90,91).

Drhtavica i povišena temperatura javljaju se kada je broj leukocita u dozi trombocita $> 5 \times 10^8$. Minimalna akumulacija citokina IL -1 β , IL-6, IL-8 nađena je ako broj leukocita u dozi trombocita ne prelazi $1 \times 10^8/l$. Za smanjenje akumulacije citokina preporuka je da broj leukocita bude niži od $1.7 \times 10^9/l$. Za prevenciju HLA imunizacije potrebno je redukovati leukocite na $\leq 1.5 \times 10^6$ po dozi. Primenom filtera tokom proizvodnje trombocitnih produkata postiže se 4 log redukciju leukocita, odnosno 99.99% leukocita bude uklonjeno, broj rezidualnih leukocita u trombocitom produktu niži je od $1 \times 10^6/l$ (92, 93,94).

U novije vreme sa ciljem povećanja bezbednosti transfuzije primenjuje se postupak redukcije patogena (PRT) u ćelijskim krvnim komponentama. Nakon primene

ovih postupaka broj trombocita je stabilan i nema porasta koncentracije enzima laktične dehidrogenaze (LDH), što ukazuje na odsustvo ćelijske lize. (95,96).

Trombociti zadržavaju kvalitet u odnosu na količinu ATP deponovanog u granulama i mitohondrijalnu funkciju. Blago povišenje citokina posle PRT smanjuje se dodatnim količinama magnezijuma i kalijuma u aditivnom rastvoru. Zbog toga je potrebna rana resuspenzija trombocita tokom PRT. (36).

Reakcije koje imaju i sliku FNHTR i alergijske reakcije

Blage reakcije imaju svojstva blage febrilne i blage alergijske reakcije.

Umereno teška ima svojstva obe reakcije od kojih bar jedna ima težinu umereno teške transfuzijske reakcije (57). Teška reakcija ima svojstva obe reakcije od kojih bar jedna ima težinu teške transfuzijske reakcije.

Alergijske transfuzijske reakcije

Incidenca alergijskih transfuzijskih reakcija (ATR) varira od 1:3–1:300 Bakdash S. (76), 0.03% po Karim F. (77), 3–7% (Hirayama), (97), oko 2% (Savage) (98), 0.09–21% po Geiger TL (99) a na nju utiču primena premedikacije, načina praćenja i prijavljivanja reakcije.

Blage alergijske reakcije su česte, javljaju se kod 12% primalaca transfuzija trombocita, tokom transfuzije i do 4 sata posle transfuzije. Obuhvataju prolazno crvenilo - eritem, urtikariju ili molbiliformi raš sa pruritusom. Umereno teška alergijska reakcija ispoljava sa vizingom ili lokaliziranim angioedemom, konjuktivalnim edemom, periorbitalnim eritemom ili edemom, sa ili bez crvenila/urtikarije/raša/. (Reakcije se javljaju se kod bolesnika sa subklasa specifičnim anti- IgA antitelima.)

Teška alergijska reakcija zahteva urgentnu medicinsku intervenciju zbog bronhospazama, stridora, anigoedema, otok jezika i uvule i utiče na produžetak hospitalizacije. Incidenca je 1:20 000–1:47 000 (57), po Karim F. 0.002% (77).

Najteža životno ugrožavajuća, generalizovana ili sistemska hipersenzitivna reakcija sa rapidnim razvojem opstrukcije u disajnom putu, problemima sa disanjem ili cirkulatornim problemima je anafilaksna reakcija. Javlja se kod bolesnika sa kompletnim deficitom IgA (IgA od 0.05 mg/dl i niži ili klasa specifična anti-IgA antitela) (57).

U patogenezi alergijske reakcije kao faktori nastanka uključeni su: davalac preko produkta (načina pripreme i dužina njegovog skladištenja, prisustvo plazma medijatora u krvnoj komponenti) i primalac (atopičnom predispozicijom). ATR su većinom multifaktorijalne. Atopična predispozicija može biti genetski uslovljena i tada je hronična za razliku od subakutne, stečene predispozicije koja je pasivna ili u sklopu inflamatorne bolesti (100).

Plazmatski medijatori mogu biti proteini (IgA, haptoglobin), RANTES (CCL5) molekuli koje trombociti odpuštaju i koji se akumuliraju tokom skladištenja kao i C3, C4 komponenta komplementa koje mogu direktno aktivirati alergijske efektorne ćelije i izazvati ATR. Za alergiju mogu biti odgovorna i antitela nastala protiv plasticizera, etilen oksida – sredstva za sterilizaciju plastičnog pribora i kesa (97).

Težina alergijske reakcije najvećim delom zavisi od primaočeve predispozicije i osetljivosti u vreme transfuzije, a potom i količine medijatora. Najmanji uticaj na ATR ima davalac trombocita. Retki su slučajevi da je donor povezan sa ATR nezavisno od primaoca (multimerični IgE, anti - CD36). Opisana su dva puta nastanka ATR:

Alergen zavisni put nastanka reakcije / imunološki mehanizam

- Alergija na proteine plazme - odnosi se na alergijske anafilaktične reakcije kod bolesnika sa IgA ili haptoglobin deficijencijom, ređe deficitom C4 komponente komplementa. Anti IgA antitela nastaju kod bolesnika koji imaju manje od 0.5 mg/l IgA u serumu ili nemaju jednu od subklasa IgA: IgA1 ili IgA2.
- Hemijski alergeni – metilen plavo, sa kojim se vrši viralna inaktivacija plazmatskih komponenti
- Hrana kao alergen – npr. pasivni transport kikiriki alergena primaocu koji ima IgE antitela na glavni alergen kikirikija Ara h2, koji je prisutan u krvi donora 24h posle ingestije.
- Mastocitima i bazofilima posredovana imuna reakcija - alergen se veže za IgE antitelo koje je vezano za FcεR receptore na mastocitima, dolazi do aktivacije mastocita i otpuštanja histamina. Ukoliko se alergen veže za IgG antitelo koje je vezano za FcγR receptor na bazofilu, po njegovoj aktivaciji otpušta se trombocitni aktivirajući faktor (*platelet-activating factor*, PAF). Smatra se da i neutrofili i monociti imaju ulogu u nastanku alergijskih reakcija na isti način.

IgG može direktno izazvati anafilaksu direktnom aktivacijom komplementa (C3a, C4a, ili C5a) (97,98).

Alergen nezavisni put nastanka reakcije / neimunološki mehanizam

Supernatant skladištenih trombocitnih koncentrata sadrži: vaskularni endotelni faktor rasta, solubilni CD40 ligand, histamine, transforming faktor rasta - β 1, RANTES. Vezivanjem BMR za njihove receptore na površini mastocita i bazofila dolazi do njihove aktivacije i sekrecije histamina, odnosno PAF. Za indukciju kliničke reakcije treba infundovati signifikantnu količinu BMR koje menjaju imunu funkciju primaoca (97).

Medijatori ATR

Primarni medijator Tipa 1 hipersenzitivnosti je histamin. Izlučuje se u krv odmah po vezivanju alergena ili aktivacije mastocita ili bazofila. Histamin je prisutan i u krvnim komponentama, i njegova količina zavisi od broja leukocita, dužine skladištenja i stepena leukoredukcije. Lipidni medijatori "kasne faze" alergijske reakcije leukotrijeni, prostaglandini i PAF imaju pik koncentracije 6-8h od ekspozicije alergenu.

Laboratorijska ispitivanja ATR

Usmerena su ka otkrivanju antitela klase IgE i IgG na IgA i haptoglobin (Hp).

Triptasa test otkriva povišen nivo triptaze koja je odraz aktivacije mastocita u sistemske anafilaksi i akutim alergijskim reakcijama.

Test aktivacije bazofila – aktivacija bazofila se prati preko ćelijskih markera CD63, CD203c protočnom citometrijom, posle inkubacije seruma bolesnika sa određenim alergenom (97,98).

Učestalost alergijskih reakcija smanjuje se uklanjanjem plazme iz trombocitnih produkata s jedne strane, a s druge strane primenom premedikacije primaocu (99,101, 102, 103).

Pirogene –transfuzijske reakcije

Pirogene transfuzijske reakcije nazivaju se još i septične transfuzijske reakcije. Nastaju zbog kontaminacije trombocitnog produkta bakterijama sa kože davaoca tokom kolekcije krvi/trombocita, odnosno tokom venepunkcije davaoca (*Staphilococcus aureus*, *Streptococci*, *Diphtheroidni bacilli*) ili unetim iz spoljašnje sredine tokom

obrade prikupljene krvi – procesinga (*Staphilococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherihia coli*) a ređe, zbog asimptomatske bakteremije davaocau vreme davanja krvi/trombocita.

Incidenca bakterijske kontaminacije za trombocitne komponente je 1:5000, odnosno 0.02%. Rizik za nastanak transfuzijom izazvane sepse nakon transfuzije afereznih trombocita je 1:108 000, a rizik od smrtnog ishoda zbog sepse za istu komponentu je 1:500 000. Za koncentrate trombocita rizik za sepsu je značajno veći i iznosi 1:25000, a za smrtnost od sepse 1:250 000.

Ispoljavaju se febrilnošću ≥ 39 °C, groznicom, tahikardijom, dispnejom, mučninom i povraćanjem unutar 4h od transfuzije trombocita. Diferencijalno dijagnostički liče na FNHTR, HTR ili TRALI (104).

Kod imunosuprimiranih i neutropeničnih bolesnika mogu završiti septičnim šokom i letalnim ishodom. Endotoksini bakterija stimulišu makrofage i endotelne ćelije vodeći masivnom oslobađanju proinflamatornih citokina IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , NO (azot monoksid) koji aktivirajući komplement i sistem koagulacije dovode do inflamacije, DIK-a, hemoragije i smrti (105).

Trombocitni produkti nose od svih krvnih komponenti najveći rizik bakterijske kontaminacije jer se čuvaju na sobnoj temperaturi u sredini bogatoj proteinima i kiseonikom. Umereno teške i letalne septične reakcije dešavaju se pri koncentraciji bakterija $\geq 10^5$ CFU/ml. Inicijalni inokulum uvek je mali < 10 CFU/ml ali sa obzirom na to da se inficirane doze trombocita skladište 2-5 dana na temperaturi 22°C u vreme transfuzije sadrže prosečno 10^2 - 10^9 CFU/ml (104).

U postupku zbrinjavanja septične transfuzijske reakcije važno je uzeti od primaoca uzorak krvi za hemokulturu pre primene antibiotika, i uzorak iz svake doze trombocita koje treba zasejati u roku do 4h od pojave simptoma reakcije. Odmah treba staviti u karantin sve krvne komponente istog donora do završetka isptivanja (106).

Prema sistemu *hemovigilance* Kanade klasifikacija bakterijske kontaminacije krvnih komponenti (Transfusion Transmitted Injuries Surveillance System - TTISS Canada) sprovodi se na sledeći način:

A. Bakterijska kontaminacija se smatra *thogućom*" ako su ispunjeni sledeći uslovi: da je hemokultura krvi primaoca pozitivna, da su isključene jatrogena ili laboratorijska kontaminacija uzorka krvi, da primalac ima znake i simptome sepse (koju ništa drugo

ne objašnjava) a hemokultura krvne komponente nije rađena (uzorak za analizu nije bio dostupan ili bakteriološka kultura nije ni tražena).

B. Bakterijske kontaminacija se smatra "*verovatnom*" ako je hemokultura krvne komponente ili krvnog proizvoda pozitivna, isključene su jatrogena ili laboratorijska kontaminacija uzorka krvi, primalac ima znake i simptome sepse (koju ništa drugo ne objašnjava) dok hemokultura krvi primaoca nije rađena ili je negativna, ali je primalac već uzimao antibiotike.

C. Bakterijske kontaminacija je potvrđena ako se ista bakterija se nalazi kod recipijenta i u krvnoj komponenti krvi ili krvnom derivatu, a sumnja da se radi o kontaminaciji uzorka krvi ili laboratorijskoj kontaminaciji je isključena (107).

Radi prevencije bakterijske infekcije od 2004. godine se prilikom venepunkcije davaoca obavezno prvi mlaz krvi preusmerava u dodatnu kesicu koja je sastavni deo sistema za uzimanje krvi, a potom u kesu za proizvodnju krvnih komponenti. Pojedini centri uzimaju uzorak proizvedene trombocitne komponente za bakterijsku kulturu (BK). Rezultat BK se dobija nakon 12-14h inkubacije, korišćenjem ovog metoda smanjene su septične reakcije za 60% ali se skratio period korišćenja trombocita za jedan dan (108).

BacT/ALERT sistem smatra se nedovoljno senzitivnim skrining testom za bakterijsku kontaminaciju, zamenjen je BactiFlow sistemom baziranim na protočnoj citometriji (109). Drugi metod prevencije je brzi skrining *point-of-release*. Doze trombocita se testiraju neposredno pre uključivanja primaocu, jer su zapažene infekcije kod već odobrenih doza trombocita zbog proliferacije bakterija tokom perioda skladištenja. Bakterijska kontaminacija je detektovana kod 1:3000 ranije BK negativnih afereznih doza trombocita (110).

Strategije za redukciju rizika za bakterijsku sepsu obuhvataju: redukciju ekspozicije pacijenata izbegavanjem transfuzija koje nisu neophodne, uvođenje molekularnih testova za detekciju bakterija (Broad-range PCR - SepsiTest, Multiplex Real-Time PCR - LightCycler@SeptiFast) (111,112), poboljšanje metoda dezinfekcije prilikom uzimanja krvi, odbacivanje prvog alikvota krvi (oko 30 ml – prilikom uzimanja afereznih trombocita), redukciju leukocita filtracijom, optimizaciju proizvodnje i čuvanja trombocita i implementaciju patogene redukcije (113).

Tehnologija inaktivacije/redukcije patogena (PIT) podrazumeva izlaganje krvne komponente (trombocita, plazme) hemijskom sredstvu koje interreaguje sa nukleinskom kiselinom infektivnog agensa (virusa, parazita, bakterije) i vrši njegovu selektivnu inaktivaciju dok svojstva transfuzijskog produkta ostaju ne promenjena. Bakterijske spore i prioni ne mogu se inaktivirati. U upotrebi su dva sistema PIT – (psoralen-UVA) INTERCEPT i (riboflavin-UVB) Mirasol sistem (114).

S transfuzijom povezano akutno oštećenje pluća (TRALI)

Nakon oko šest sati od transfuzije plazmatskih komponenti krvi moguć je razvoj teške potencijalno smrtonosne (6-20%) reakcije u vidu respiratorog distresa sa hipoksemijom, bilateralnim plućnim infiltratima, tahikardijom i hipotenzijom (115,116). Incidenca TRALI u dečijem uzrastu, u jedinici intenzivne nege Dečije bolnice u Amsterdamu bila je 6.9% (117). U Kanadi, TRALI je imao veću učestalost u pedijatrijskoj populaciji 5.58 nego kod adulta 3.75 na 100 000 doza krvnih komponenti (eritrocita i trombocita) sa dva pika pojavljivanja u neonatalnom dobu i kod adolescenata (118).

Za etiologiju TRALI mogu biti odgovorna aloantitela u dozi krvne komponente tipa anti-HLA klase I (najčešće anti-HLA A2, anti-HLA B12), klase II ili specifičnih neutrofilnih aloantitela (anti-HNA3a), ređe antitela u plazmi bolesnika, a najčešće neutrofilni lipidi (kao lizofosfatidilholin) koji se otpuštaju s trombocita tokom perioda njihovog skladištenja. TRALI uzrokuju jako reaktivna anti-neutrofilna antitela ali i slabo reaktivna antitela ako se javljaju kod bolesnika koji već ima autoimuno obolenje ili sistemsku infekciju. Anti-leukocitna antitela i otpušteni neurofilni lipidi aktiviraju neutrofile intravaskularno koji postaju hiper reaktivni i otpuštaju proinflamatorne medijatore: IL-8, citotoksični H_2O_2 i toksične enzime koji oštećuju plućni endotel povećavajući vaskularnu propustljivost. Zbog zaustavljanja rigidnih hiper reaktivnih neutrofila u plućnim kapilarama i eksudacije razvija se ne kardiogeni plućni edem.

Ukoliko su anti-HLA antitela klase II uzrok TRALI, ona se vežu za monocite koje stimulišu na produkciju inflamatornih citokina, koji povratno aktiviraju neutrofile. Moguće je da se anti-HLA antitela klase I jednog donora vežu za HLA antigen molekule ispoljene na trombocitima drugog donora u pulu trombocita (119,120).

Dijagnoza TRALI postavlja se identifikacijom anti - HLA antitela citotoksičnim testom, ELISA testovima, Luminex tehnologijom na bazi perli ili protočnom citometrijom (PC) a antitela protiv neutrofila granulocitnim aglutinacionim testom (GAT) i imobilizacijom granulocitnih antigena monoklonskim antitelima (MAIGA), kao i PC. Negativni testovi anti-HLA antitela i anti-neutrofilnih antitela (20-30%) ne isključuju dijagnozu. Kod bolesnika bez pristunih pomenutih antitela obično postoji okidač za ispoljavanje TRALI: sepsa, masivna transfuzija, operativni zahvat. Diferencijalno dijagnostički razmatraju se kardiogeni edem pluća, s transfuzijom povezana dispneja (TAD) i transfuzijom izazvano preopterećenje cirkulacije (TACO) (121).

TRALI je često prolaznog karaktera te se simptomi povlače za 48-96 sati, ali kod težih oblika reakcije potrebna je nadoknada O₂ i mehanička ventilacija. Oporavljeni bolesnici nemaju sekvele na plućima. Važne su mere prevencije, upotreba plazmi ženskih donora samo ukoliko su bez prethodnih trudnoća i upotreba pulirane plazme tretirane solvent deterdžentom (SD plazma) (122).

TACO je okarakterisan sa akutnim respiratornim distresom, tahikardijom, povećanjem arterijske tenzije i znacima akutnog edema pluća i manifestuje se u toku šest sati od primljene transfuzije. Porast B tipa natriuretičkog peptida ide u prilog TACO (123, 124). Kod bolesnika koji su imali TRALI ili mogući TRALI izmerene su povišene vrednosti citokina IL-6 i IL-8 dok je kod bolesnika sa TACO bio povišen IL-10. Merenje navedenih citokina bila bi pomoć u kliničkom razlikovanju transfuzijskih reakcija sa sličnim ispoljavanjem (125).

S transfuzijom povezana dispneja (TAD)

TAD - predstavlja vrstu blagog respiratornog distresa unutar 24h od transfuzije. Dispneja se nemože povezati sa ranijim obolenjima i statusom bolesnika, a kriteriji za dijagnozu TRALI, TACO ili alergijsku reakciju nisu ispunjeni. Takvu dispneju smatramo primarnim TAD, za razliku od sekundarne TAD u toku drugih reakcija: HTR, anafilakse, alergijske reakcije i transfuzijom prenešene bakterijske infekcije (126,127).

Najteže transfuzijske reakcije, s transfuzijom povezana bolest kalem protiv domaćina (TA GVHD) i post transfuzijska purpura (PTP) vrlo retko su komplikacije transfuzija trombocita.

S transfuzijom povezan Graft Versus Host Disease (TA-GVHD)

TA-GVHD javlja se kod prematurusa, novorođenčadi sa prethodnim intrauterinim transfuzijama ili eksangvinotransfuzijama, imunodeficientnih bolesnika, kod bolesnika sa hematološkim malignitetima koji primaju imunosupresive i ukoliko je davalac homozigot a primalac haploidentičan za određeni HLA lokus. Klinička slika ista je kao kod GVHD nakon transplantacije - kožne promene, simptomi od strane GIT: mučnina, povraćanje, dijareja, hepatitis, pored toga javlja se i aplazija kostne srži sa pancitopenijom. Za etiopatogenezu odgovorni su davaočevi vijabilni T limfociti, tačnije klonovi CD4 i CD8 citotoksičnih T limfocita i klon CD4 limfocita koji produkuje i sekretuje velike količine TNF β i IL-2 koji posredno dovode do TA-GVHD (73). Terapijski efekat kortikosteroida, metotreksata, antitimocitnog globulina, ciklosporina A, nafamostat metilata i monoklonskih OKT3 antitela najčešće ostaje bez efekta, te je smrtnost preko 90%. Prevencija je zato ključna i podrazumeva ozračivanje γ zracima dozom od 25-50 Gy ili leukoinaktivaciju UVA ili UVB zracima svih celularnih krvnih komponenti za bolesnike sa rizikom za razvoj TA GVHD, kao i izbegavanje transfuzija od bliskih srodnika i njihovim ozračivanjem. Na razvoj TA-GVHD utiče količina unetih leukocita, starost krvne komponente (sveže komponente nose veći rizik) i imunog statusa primaoca (128).

Post-transfuzijska purpura

Post-transfuzijska purpura ispoljava se sniženjem broja trombocita na ispod $10 \times 10^9/l$ sa petehijalnim krvarenjima po koži i sluzokožama i često epistaksom u periodu od 2-14 dana od transfuzije. Postoji više objašnjenja za etiopatogenezu. U teoriji imunih kompleksa na donorskim trombocitima i kao solubilni u plazmi prisutni su trombocitni antigeni, dolazi do stvaranja imunih kompleksa sa antitrombocitnim antitelima u plazmi primaoca, koji vrše destrukciju trombocita. Po teoriji imunskog odgovora nastaju autoantitela na trombocitne antigene, ona razaraju antigen pozitivne trombocite davaoca ali i antigen negativne trombocite primaoca. U teoriji solubilnih antigena, antigeni iz plazme adsorbuju se na primaočeve trombocite i pretvaraju ih iz antigen negativnih u antigen pozitivne. Diferencijalno dijagnostički razmatraju se TTP, ITP, HIT i DIK. Terapija su antigen negativni trombociti i visoke doze IVIG dva do pet

dana, te kortikosteroidi. Primena izmena plazme smanjuje antitela u cirkulaciji (najčešća su HPA-1a) ali nosi rizik od daljeg sniženja broja trombocita a time i pojave intrakranijalnog krvarenja. PTP predstavlja nepredvidivu bolest sa egzacerbacijama i tri godine posle inicijalne epizode, a smrtnost je zbog hemoragije i dalje visoka i iznosi 5-10%. U mere prevencije ubraja se pored leukoredukcije i nošenje kartice sa dijagnozom PTP kako bi se pravovremeno obezbedili antigen negativni trombociti u slučaju potrebe (129,130).

Pasivna aloimuna trombocitopenija (PAIT)

Trombocitopenija nastaje naglo, par sati nakon primljene transfuzije (obično doze plazme) i traje kratko, par sati do nekoliko dana. To je potpuno u kontrastu sa nastankom PTP. Specifična anti-trombocitna antitela anti-HPA-1a, prisutna su u plazmi davaoca ili na trombocitima primaoca. Smatra se da su antitela sto procentno vezana za trombocite primaoca i da ih nema slobodnih u njegovoj plazmi. Težina trombocitopenije varira ovisno o broju antigenih mesta na trombocitima (131).

Druge reakcije izazavane transfuzijom

Hipotenzivna transfuzijska reakcija – prestavlja nagli pad sistolne tenzije za 30 i više mm Hg unutar jednog sata od završetka transfuzije, tako da je sistolni pritisak jednak ili niži od 80 mm Hg. Većinom se ova reakcija javlja odmah u prvim minutama transfuzije i česta je kod bolesnika koji uzimaju ACE inhibitore. Hipotenziju mogu pratiti zažarenost lica i simptomi od stane GIT. Diferencijalno dijagnostički treba isključiti ranije hipotenzije bolesnika i alergijske reakcije s hipotenzijom. U dečijem uzrastu hipotenzivne reakcije na transfuzije trombocita retko se ispoljavaju (132).

Hiperkalemija svaki abnormalni nivo kalijuma ≥ 5 mml/l, unutar jednog sata od transfuzije treba smatrati za hiperkalijemiju povezanu sa transfuzijom (ukupni porast 1.5 mml/l.)

Stanja povezana sa transfuzijom koja se ne mogu svrstati ni pod jednu navedenu transfuzijsku reakciju, a za njihovu pojavu ne postoje drugi rizici osim transfuzije nazivaju se neklasifikovane komplikacije transfuzije (123).

CILJ RADA

1. Utvrditi kod kojih bolesnika na potpornoj terapiji transfuzijama trombocita postoji refraktornost na transfuzije trombocita i koja je njena etiologija (ne imuna refrakternost/ imuna refrakternost).
2. Proceniti efektivnost doza trombocita s negativnim rezultatom interreakcije primenjenih kod bolesnika s imunom refraktornosti.
3. Utvrditi učestalost alergijskih i febrilnih nehemoliznih transfuzijskih reakcija u ispitivanoj grupi pedijatrijskih bolesnika.
4. Odrediti nivoe interleukina IL-6 i IL-8 u uzorcima plazme bolesnika i iz doza trombocita koje su izazvale febrilnost.
5. Hemokulturama utvrditi da li postoji bakterijska infekcija kod bolesnika ili bakterijska kontaminacija doza trombocita.
6. Proceniti efektivnost doza trombocita koje imaju aditivni rastvor za trombocite umesto plazme davaoca, nakon primene kod bolesnika s alergijskim reakcijama.

MATERIJAL I METODE

ISPITANICI

Ispitivanjima koja su sprovedena od 2011 do 2015. godine obuhvaćeno je 239 bolesnika Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić" uzrasta od jednog meseca do 18 godina, koji su primali transfuzije trombocita u terapijske ili preventivne svrhe. Bolesnici su lečeni u Službi za ispitivanje i lečenje hematoloških i onkoloških bolesnika, Odeljenju za transplantaciju kostne srži sa laboratorijom za kriobiologiju i Službi za pedijatrijsku intenzivnu negu i lečenje.

Ispitivana grupa bolesnika stratifikovana je prema: uzrastu (odojčad - od jednog meseca do godinu dana, dete od jedne do 12 godina i adolescenti – od 13 do 18 godina), polu, dijagnozi (leukemije, limfomi, aplastične anemije, solidni tumori, druge dijagnoze), terapiji za osnovnu bolest (hemioterapija sa ili bez zračne terapije, autologne ili alogene transplantacije kostne srži ili perifernih matičnih ćelija hematopoeze), broju dana sa vrednostima trombocita nižim od $10 \times 10^9/l$ (manje ili jednako pet dana, i više od pet dana) ili broju primljenih doza trombocita (≤ 20 , 21-50, više od 50). Terapija za osnovnu bolest primenjivana je u navedenoj Službi/Odeljenju a u jedinici intenzivne nege kada je stanje bolesnika bilo vitalno ugrožavajuće i kad je zahtevalo kontinuirani intenzivni nadzor i praćenje.

Ispitivanje nivoa interleukina IL-6 i IL-8 izvršeno je iz uzoraka doza trombocita koje su izazvale transfuzijsku reakciju.

Kontrolna grupa

Kontrolnu grupu činila su 155 bolesnika uzrasta od jednog mesecado 18 godina koji su u periodu 2011-2012. godine u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta "Dr Vukan Čupić" Srbije primali transfuzije trombocita u terapijske ili preventivne svrhe a nisu ispoljili niti transfuzijske reakcije niti refrakternost na transfuzije trombocita.

Kontrolnu grupu za ispitivanje nivoa interleukina IL-6 i IL-8 iz doza trombocita činili su uzorci iz doza trombocita koje nisu izazvale transfuzijsku reakciju.

UZIMANJE UZORAKA KRVI

Uzorci krvi su dobijeni punkcijom periferne vene, ukoliko to nije bilo moguće korišten je centralni venski kateter uz propiranje fiziološkim rastvorom i odbacivanjem određenog manjeg volumena krvi ovisno o uzrastu deteta. Za dobijanje plazme krv je uzimana u vakutajner epruvete (proizvođač - *Vacutainer tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA*) koje sadrže 3,8% (0,129M) natrijum citrat, sa odnosom krvi i antikoagulansa je 10:1. Sadržaj epruvete je pažljivo izmešan okretanjem epruvete naniže tri puta.

Za dobijanje seruma korišteni su vakutajner epruvete (proizvođač - *Vacutainer tubes, greener bio-one Z Serum Clot Activator*) bez antikoagulansa.

Uzorci krvi centrifugirani su u prvih 60 minuta od venepunkcije, na 2000 g obrtaja, na sobnoj temperaturi (18-25°C) tokom 15 minuta. Uzorci citratne plazme i seruma podeljeni su na delove od po 200 µl koji su zamrznuti i čuvani na -70°C do izvođenja analiza. Za testove koagulacije uzorci plazme odmrzavani su u vodenom kupatilu na 37 °C i potom odmah analizirani. Uzorci za D-dimer i vWF su posle odmrzavanja centrifugirani na 3000 obrtaja, 5 minuta i zatim analizirani.

Uzorci iz doza trombocita koje su izazvale reakciju podeljeni su na delove od po 200 µl, zamrznuti su i čuvani na -70°C do izvođenja analiza. Pre analiziranja odmrznuti su na sobnoj temperaturi, centrifugirani na 3000 obrtaja, 5 minuta. Za analizu je korištena supernatant plazma.

METODE ISPITIVANJA

U Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić", na Odeljenju za transfuziju krvi urađeni su imunoserološki testovi određivanja krvne grupe, direktnog i indirektnog humanog antiglobulin testa, interreakcije na doze trombocita, kao i skrining testovi hemostaze, fibrinogen Klaus, vWF antigen i D-dimeri.

Krvna slika, biohemijski parametri i C reaktivni protein urađeni su u Odseku za kliničku hemiju i hematologiju, a Interleukin 6 (IL-6) u Odseku za laboratorijsku endokrinologiju i skrining programe pri Biohemijskoj laboratoriji, te nivo imunoglobulina IgA u Laboratoriji za imunologiju i protočnu citometriju. Bakteriološko ispitivanje telesnih sekreta i ispitivanje bakterioloških aerobnih i anaerobnih hemokultura bolesnika i hemokultura doza trombocita koje su izazvale transfuzijske reakcije urađeno je u Laboratoriji za kliničku mikrobiologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić.

U Centru za nuklearnu medicinu Kliničkog Centra Srbije urađeno je ispitivanje IL-8. Pri Institutu za transfuziju krvi Srbije (ITK), Odeljenju za tipizaciju tkiva, na Odseku za serološku tipizaciju HLA urađena je analiza i krosmeč za anti-HLA antitela, dok su u Zavodu za transfuziju krvi Vojvodine ispitivana antitrombocitna anti- HPA antitela. Western blot metodom otkrivanje antitrombocitnih antitela klase IgM i IgG izvršeno je na Odeljenju za imunoheмиjska ispitivanja ITK.

Proizvodnja doza trombocita u aditivnom rastvoru za trombocite izvršena je u Institut za transfuziologiju i hemobiologiju VMA.

U cilju praćenje terapijskog efekta transfuzija trombocita korišten je porast korigovanog broja trombocita (KBT) i procenat oporavka trombocita (%OT).

$$KBT = \frac{\text{postranzfuzioni} - \text{pretranzfuzioni br trombocita (po } \mu\text{l)} \times \text{telesna površina (u m}^2\text{)}}{\text{broj transfundovnih trombocita (} \times 10^{11}\text{)}} \quad \text{Bishop et all. (1992)}$$

$$\%OT = \frac{\text{postranzfuzioni} - \text{pretranzfuzioni br trombocita (po } \mu\text{l)} \times \text{volumen krvi (u ml)}}{\text{broj transfundovnih trombocita (} \times 10^{11}\text{)}} \quad \text{Filip et all. (1976)}$$

Volumen krvi za decu iznosi 80ml/kg telesne mase, za odrasle osobe (≥ 18 god.) 75 ml/kg telesne mase.

Svim bolesnicima određivan je 24 časovni porast KBT i procenat OT. U dalji postupak ispitivanja refraktarnosti na transfuzije trombocita uključeni su oni bolesnici

kojima je u dva merenja %OT <20% i porast KBT <4.5x10⁹/l 24 sata od transfuzije, njima su isti parametri određivani i jedan sat posle transfuzije (pri čemu je povoljan odgovor %OT >30% i porast KBT > 7.5x10⁹/l).

Laboratorijske analize

Krvne slike bolesnika rađene su s automatskim brojačima krvnih ćelija HmX – Beckman Coulter i CeLL-Dyn3700 – Abbott metodom impedanca. Broj leukocita i diferencijalna formula određivani su MAPSSTM metodom a broj trombocita dvougonaom optičkom analizom.

Referentne vrednosti za broj trombocita za uzrast do 5 god. starosti su 217-553 x10⁹/l, od 6-15 god. 154-521 x10⁹/l, od 16-20 god. 140-408 x10⁹/l.

Referentne vrednosti za broj eritrocita za uzrast od 1 meseca do godinu dana 2.8-5.2 x10¹²/l, od 1-3 god. 3.6-5.2 x10¹²/l, od 5 god. nadalje 3.7-5.8x10¹²/l.

Referentna vrednost broja leukocita za uzrast od 1 meseca do godinu dana 5-19.5x10⁹/l, za 1-12 god. 6-13.5x10⁹/l, od 14-18 god. 4.5-13 x10⁹/l.

Referentna vrednost hemoglobina (Hb) za uzrast od 1m do godinu dana 9.0-16.6 g/dl, od godinu dana do 3 godine 10.7-13.1 g/dl, od 5-10 god. 10.7-15.6g/dl, više od 10 god; vrednosti za adulte, 12.3-17.5 g/dl.

Referentna vrednost Hematokrita (Hct) za uzrast od 1 meseca do 3 godine 30-46%, od 3-10 godina 31-43%, više od 10 god. 33-45%.

Biohemijske analize rađene su na biohemijskom analizatoru Roche Cobas c501.

Biohemijske analize za ispitivanje funkcije jetre

Ukupni proteini rađeni su metodom kolorimetrije, biuret a referentne vrednosti su se kretale od 51-73 g/l za uzrast do 1 godine, pa do 64-83 g/l za 18 godina. Princip određivanja ukupnih proteina: Kolorimetrijski test metodom krajnje tačke (end-point metoda), biuretska reakcija. Divalentni bakar reaguje u alkalnoj sredini sa peptidnim vezama proteina i formira karakteristični ljubičasto obojeni biuretski kompleks. Natrijum kalijum tartarat sprečava precipitaciju bakar hidroksida, a kalijum jodid sprečava autoredukciju bakra. Intenzitet boje je direktno proporcionalan koncentraciji proteina. Određuje se merenjem povećanja absorbancije na 552 nm.

Albumini su rađeni kolorimetrijskom metodom, brom krezol zeleno (BCG). Referentne vrednosti za uzrast do 14 godina su 38-54 g/l a za 15-18 god. 32-45 g/l. Princip određivanja albumina: Fotometrijski test metodom krajnje tačke (end-point metoda) , reakcija sa BCG- brom krezol zelenim. Pri pH od 4.1, albumin pokazuje dovoljan katjonski potencijal za vezivanje bromkrezol zelene (BCG), anjonske boje, tako da formira plavo zelene kompleks. Intenzitet plavo zelene boje je direktno proporcionalan sa koncentraciji albumina u uzorku. Određuje se praćenjem povećanja absorbance na 583 nm

Bilirubin ukupni i direktni rađeni su kolorimetrijskom Diazo metodom. Princip određivanja ukupnog bilirubina: Diazo metoda (2-point end metoda). Ukupni bilirubin, u prisustvu pogodnog agensa za rastvaranje, kupluje se sa diazonijum jonom u jako kiselj sredini (pH 1-2). Intenzitet crvene boje stvorenog azobilirubina proporcionalan je koncentraciji ukupnog bilirubina i određuje se fotometrijski na talasnoj dužini 600/546 nm.

Princip određivanja direktnog bilirubina: Diazo metoda.

Konjugovani bilirubin i δ -bilirubin (direktni bilirubin) direktno reaguju sa 3,5 dihlorfenil diazonijum soli u kiselj sredini i formiraju azobilirubin crvene boje. Intenzitet formirane crvene boje je direktno proporcionalan koncentraciji direktnog (konjugovanog) bilirubina i određuje se fotometrijski. Referentne vrednosti za ukupni bilirubin su $<17 \mu\text{mol/l}$ a za direktni bilirubin $<3.4 \mu\text{mol/l}$.

Enzimi transaminaze - aspartat transaminaza (AST) i alanin transaminaza (ALT) rađene su procedurom referentnog merenja enzimske aktivnosti prema Internacionalnoj federaciji kliničke hemije i laboratorijske medicine (IFCC), za oba enzima referentne vrednosti su do 40 IU/l.

Princip određivanja aspartat amino transferaze (AST):

Ovaj test je u skladu sa preporukama IFCC, ali je optimizovan u smislu izvođenja i stabilnosti. AST u uzorku katalizuje prenošenje amino grupe između L-aspartata i 2-oksoglutarata pri čemu se formira oksalacetat i L-glutamat. Oksalacetat zatim reaguje sa NADH u prisustvu malat dehidrogenaze (MDH), tako da formira NAD^+ . Brzina oksidacije NADH direktno je proporcionalna katalitičkoj aktivnosti AST, koja se određuje merenjem smanjenja apsorbance na 340nm.

Princip određivanja alanin amino transferaze (ALT):

Ovaj test se izvodi prema preporukama IFCC, ali je optimiziran u smislu izvođenja i stabilnosti. ALT katalizuje reakciju između L-alanina i 2-oksoglutarata. Formirani piruvat se redukuje sa NADH u reakciji koju katalizuje laktat dehidrogenaza (LDH) tako da formira L-laktat i NAD^+ . Brzina oksidacije NADH direktno je proporcionalna katalitičkoj aktivnosti ALT. Određuje se merenjem smanjenja apsorbance na 340nm.

Elektrolitni status

Ioni K^+ , Na^+ , Cl^- rađeni su metodom indirektna potenciometrije.

Referentne vrednosti za K^+ za uzrast od 1-6 meseci 3.5-5.6 mmol/l, 7 meseci-1 god. 3.5-6.1 mmol/l, >1 god. 3.3-4.6 mmol/l, odrasli 3.7-5.5 mmol/l.

Referentne vrednosti za Na^+ , za uzrast od 1 meseca nadalje 132-141 mmol/l, odrasli 136-145 mmol/l.

Referentne vrednosti za Cl^- su 97-107 mmol/l.

Neorganski fosfat rađen je metodom kolorimetrije, amonijum molibdat. Referentne vrednosti za uzrast do 1 god. 1.15-2.15 mmol/l. Od 1-12 god. 0.95-1.95, od 13-18 god. 0.95-1.75 mmol/l.

Bikarbonat je rađen enzimskom metodom, PEPC/MDH. Referentne vrednosti su 18-27 mmol/l. Princip određivanja bikarbonata: Bikarbonati reaguju sa fosfoenolpiruvatom (PEP) u prisustvu PEPC i stvaraju oksalacetat i fosfat. Ova reakcija je kuplovana sa reakcijom u kojoj je uključen prenos jona vodonika iz NADH analoga do oksalacetata u prisustvu MDH. Rezultat potrošnje analoga NADH izaziva smanjenje absorbancije na 409 nm, što je proporcionalno koncentraciji bikarbonata u uzorku koji se analizira.

C- reaktivan protein (CRP) rađen je imunoturbidimetrijskom testom na analizatoru Roche Cobas c501, referentna vrednost je do 5 mg/l. Princip određivanja CRP:

Humani CRP aglutinira lateks čestice obeležene monoklonskim anti-CRP antitelima. Koncentracija proteina je direktno proporcionalna turbiditetu koji potiče od nastalih agregata.

Rutinski skrining testovi hemostaze: protrombinsko vreme (PT), aktivirano parcijalno trombinsko vreme (APTT) i trombinsko vreme (TT) određivani su na

automatskim koagulometrima ACL 7000, Sysmex CA 1500 i BCS XP Dade Behring. Kontrolne vrednosti za PT bile su 75-120% (izraženo u procentima u odnosu na normalnu plazmu), za APTT 25-35 s, a za TT iznosile su 11-21 s.

Određivanje koncentracije fibrinogena metodom po Claussu

Koncentracija fibrinogena određivana je na automatskim koagulometrima Sysmex CA 1500 i BCS XP Dade Behring. U testu se upoređuje trombinsko vreme ispitivane i standardne plazme u prisustvu visokih koncentracija trombina (30-100 J/ml), a pri niskim koncentracijama fibrinogena u diluiranoj plazmi, kada je vreme koagulacije proporcionalno koncentraciji fibrinogena. Raspon normalnih vrednosti iznosi 1,69 - 3,92 g/l.

Ispitivanje koncentracije antigena von Willebrandovog faktora

Za određivanje koncentracije antigena von Willebrandovog faktora korišćen je automatski koagulometar ACL Elite Pro i imunoturbodimetrijska metoda, koja se zasniva na aglutinaciji lateks čestica obloženih anti-vWF antitelima posle vezivanja vWF iz ispitivane plazme. U ispitivanu plazmu dodaje se reagens koji sadrži lateks čestice obložene zečijim poliklonskim anti-vWF antitelima. Sadržaj kivete se izmeša i inkubira na 37°C. Vezivanjem antitela i vWF iz plazme dolazi do aglutinacije lateks čestica, a stepen aglutinacije je direktno proporcionalan koncentraciji vWF:Ag i meri se na osnovu stepena sniženja transmisije svetlosti usled prisustva aglutinata. Koncentracija antigena vWF u plazmi izražavana je u procentima aktivnosti faktora normalne plazme. Raspon normalnih vrednosti za krvnu grupu A, B, i AB iznosi 68.5-159.4% a za krvnu grupu O iznosi 54-133.8%.

Određivanje D-Dimera

D-Dimer pripada grupi rastvorljivih derivata koji su formirani nakon degradacije ukrštenog stabilizovanog fibrina plazminom. Određivanje D-Dimera je izvršeno na automatskim koagulometrima ACL 7000 i ACL Elite Pro uz korištenje lateks turbidimetrijskog imuno eseja za kvantitativno određivanje, proizvođača IL instruments.

D-Dimer lateks reagens je suspenzija polistirenskih lateks čestica koje su obložene sa monoklonskim antitelima visoko specifičnim za D-Dimer domen (fibrin rastvorljivi

derivat). Kada se plazma bolesnika koja sadrži D-Dimere pomeša sa lateks reagensom i reakcionim puferom koji su u sastavu D-Dimer kita, obložene lateks čestice aglutiniraju. Reakcija aglutinacije je direktno proporcionalna koncentraciji D-Dimera u uzorku i određuje se merenjem smanjenja emitovane svetlosti na 405 nm koje je prouzrokovano agregatima. Referentna vrednost D-Dimera je < 230 ng/ml.

Imunološka testiranja

Određivanje proteinske frakcije seruma - IgA

IgA je određivan imunonefelometrijskom kvantitativnom metodom na BN ProSpec SIEMENS sistemu. Referentne vrednosti za uzrast do godinu dana 0.68 ± 0.31 g/l., od 1-6 god. $0.62-0.88 \pm 0.25-0.34$ g/l., od 7-12 god. $1.05-1.34 \pm 0.35-0.48$ g/l., od 13 do 15 god. $1.39-1.48 \pm 0.31-0.58$ g/l., više od 15 godina 0.9-4.5 g/l.

Nivo IL6

U plazmi bolesnika pre i posle transfuzijske reakcije i dozama trombocita određivan je IL6 kvantitativno na automatskom analizatoru Access Immunoassay Systems Beckman Coulter uz korišćenje IL-6 hemiluminiscentnog immunoezimskog testa. Uzorak plazme sipa se u udubljenja mikrotitracione ploče zajedno sa paramagnetnim česticama koje su obložene mišjim monoklonskim anti humanim IL-6, blokirajućim reagensom i alkalna fosfataza konjugatom. Nakon inkubacije materijal koji se vezao za čvrstu fazu mikrotitracione ploče zadržava se u magnetnom polju dok se nevezani odstranjuje pranjem. Iza toga dodaje se hemiluminiscentni substrat Lumi-Phos. Dolazi do razvoja svetlosti koja se meri luminometrom. Količina proizvedene svetlosti direktno je proporcionalna koncentraciji IL 6 u uzorku. Referentne vrednosti za uzrast do 2.5 godine je < 2.9 pg/ml, za starije od 2.5 god. < 6.4 pg/ml.

Nivo IL8

U plazmi/serumu bolesnika pre i posle transfuzijske reakcije i dozama trombocita određivan je IL8 hemiluminiscentnim imunim testom na automatizovanom imunohemijskom analizatoru Immulite 1000. Ovaj analizator koristi za test specifične, antitelima ili antigenima obložene plastične kuglice, alkalnom fosfatazom obeleženi reagens i hemiluminiscentni supstrat. Kuglica je smeštena u odgovarajuću test jedinicu

(Test Unit). Test jedinica služi kao sud za imuno reakciju, inkubaciju, proces ispiranja i generisanje signala koji se obrađuje.

Nakon inkubacije uzorka sa reagensom obeleženim alkalnom fosfatazom, višak tečnosti iz reakcione čašice, u kojoj se odvijala inkubacija, se odvaja od kuglice centrifugiranjem reakcione epruvete duž vertikalne ose. Celokupni sadržaj tečnosti koji je bio u test jedinici (uzorak, reagens, i rastvor za pranje) se ovim načinom prebacuje u koaksijalnu otpadnu komoru test jedinice. Kuglica ostaje unutar reakcione epruvete bez ostataka nevezanih obeleživača. Vezana antitela se potom kvantifikuju korišćenjem dioksietan supstrata kako bi se proizvela svetlost. Svetlost se emituje kada hemiluminescentni supstrat izreaguje sa alkalnom fosfatazom koja se vezala za kuglicu. Intenzitet emitovane svetlosti je proporcionalan količini analita originalno prisutnog u uzorku. Ova emisija svetlosti se detektuje kroz fotomultiplikatorsku cev – PMT (*Photomultiplier Tube*) nakon čega se računa rezultat za svaki uzorak. Referentne vrednosti za uzrast do 3 godine 25-63 pg/ml, stariji od 3 godine 5-15 pg/ml.

Utvrđivanje prisustva anti-HLA antitela

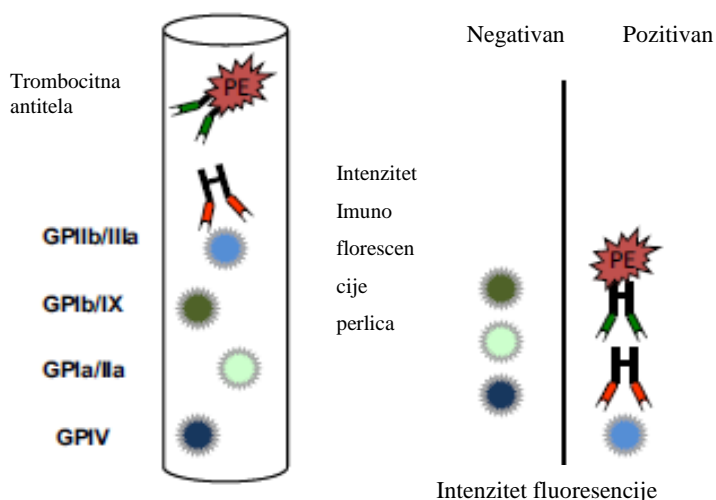
Komplemet zavisni limfocitotoksični test - LCT CDC tehnika

Limfocitotoksičnim testom ispituje se sposobnost alo ili auto anti – HLA antitela da posreduju u koplementom izazvanoj lizi donorskih limfocita iz panela. Panel limfociti (mešavina T i B limfocita) predstavljaju površinu antigena HLA klase I. Kod ispitivanja autoantitela serum i limfociti su porekla bolesnika. U polja titracione ploče usut je serum bolesnika (od nativnog do razblaženja 1/16), pozitivna i negativna kontrola a zatim dodana suspenzija limfocita, potrebno je dobro izmešati serum i limfocite tresenjem ploče i inkubirati ih 30 min na 22°C. Nakon inkubacije dodana je u svako polje mala količina (5µl) komplementa i ploča inkubirana ponovo na sobnoj temperaturi 1h. Dodavanjem boja (akridinske zelene i bromidne crvene) reakcija između antitela i limfocita postaje vidljiva. Polja ploče očitana su invertnim fluorescentnim mikroskopom, gde su vijabilni limfociti zelene boje a mrtvi crvene. Rezultat se izražava kao procenat pozitivnih testova u panelu. Ako je broj panel reaktivnih antitela (PRA) u skoru veći od 20% radi se o aloimunizaciji ili

autoantitelima na HLA antigene klase I (17). Rezultat od 21-50% predstavlja slabu pozitivnost a preko 81% jaku pozitivnost u corss-match analizi, prema American Society For Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) (76).

Luminex metoda za anti-HLA antitela

Anti-HLA antitela detektovana su kvalitativnim screening imunotestom (One Lambda LABScreen Mixed Class I & II, LSM, USA) na Luminex aparatu koji radi na principima protočne (flow) citometrije. Test se bazira na mikrosferama koje su obložene prečišćenim HLA antigenom klase I i klase II, te detektuje IgG antitela na molekule klase I HLA i klase II HLA humanog porekla. Alikvot mikrosfera se inkubira sa malim volumenom uzorka testiranog seruma. Tako senzibilisane mikrosfere se zatim ispiraju kako bi se uklonili tragovi nevezanog antitela. Tada se dodaje antihumano IgG antitelo konjugovano sa fikoeritriinom (PE). Nakon još jedne inkubacije uzorak se razređuje i analizira na Luminex aparatu. Izračunavanje jačine anti-HLA reaktivnosti mora biti korigovano za nespecifično vezivanje negativne kontrole i vrednost pozadine, što se izražava NBG odnosom (*normalized background ratio*). Normalizirani fluorescentni signal jednak je vrednosti signala mikrosfere obložene HLA antigenom klase I ili klase II umanjen za vrednost negativne kontrole. Rezultat se izražava kao negativan, graničan-siva zona, slabo i jako pozitivan, a NBG ratio >2.2 je pozitivan.



Slika 3. Princip Luminex metoda⁵

Modifikovano iz Santoso S. Progress and challenges in platelet serology ISBT Sci Series 2015; (Suppl. 1):211-28.

Utvrđivanje prisustva anti-trombocitnih antitela

Western blot metoda

Iz seruma bolesnika identifikovana su anti-trombocitna antitela IgM i IgG klase nakon njihove separacije u poliakrilamid gelu elektroforezom. Protokol testa obuhvata sledeće procese: pripremu uzorka, gel elektroforezu, transfer iz gela na membranu i imunobojanje radi detekcije proteina. Kao izvor antigena služi pul trombocita od 100 zdravih donora. Trombociti su rastvoreni u natrijum dodecil sulfatu (SDS) i njihovi proteini razdvojeni su prema molekularnoj težini pomoću SDS poliakrilamidne gel elektroforeze i potom preneti na nitrocelulozni papir. Višak aktivnih mesta blokiran je sa 3 % želatinom u Tris-glicin puferu sa 0.05% Tveen 20. Listovi nitroceluloze isečeni su u vertikalne trake i učinjeni dostupnim za reakciju sa antitelima iz seruma bolesnika.

Antitela vezana za proteine trombocita na trakama su detektovana sa peroksidazom obeleženim anti-humanim IgG ili IgM i vizualizovani sa 4-chloronaphthol/H₂O₂.

Luminex metoda za anti-HPA antitela

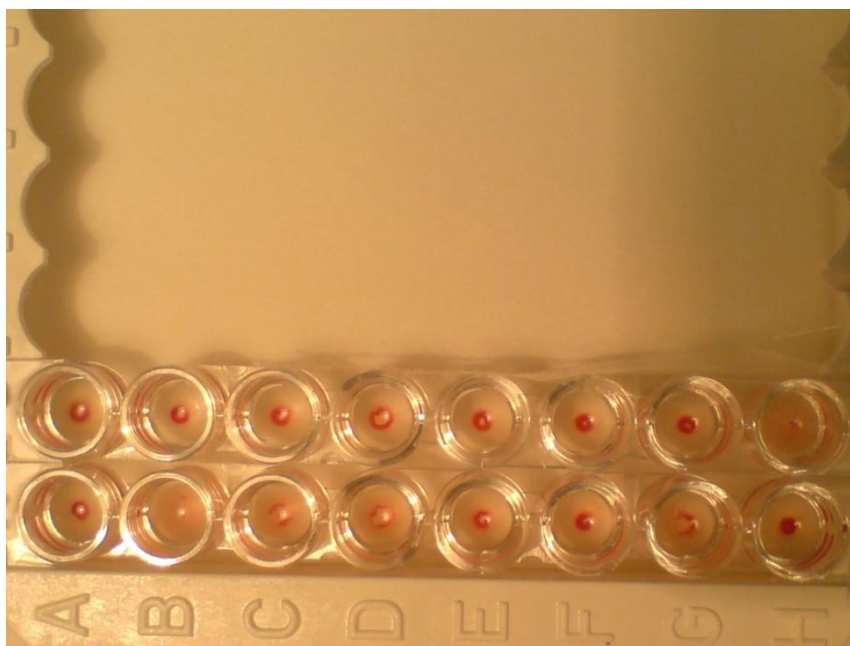
Luminex aparat i softver Luminex IS 2.3 korišćeni su za izvođenje LIFECODES Pak Lx testa. Pak Lx test je dizajniran za detekciju i razlikovanje IgG antitela na HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, GPIV i klase I HLA u humanom serumu.

Postupak detekcije započinje rekonstitucijom Pak Lx mikrosfere (familija od 100 fluorescentno obojenih polistirenskih mikrosfera veličine 5,6 mikrona koje služe i kao identifikator i kao čvrsta površina za test) i njihovom inkubacijom sa uzorkom seruma bolesnika na sobnoj temperaturi. Mikrosfere se zatim ispiraju da bi se uklonila nevezana antitela. Zatim se dodaje anti-humano IgG antitelo konjugovano sa fikoeritrinom (PE). Nakon dalje inkubacije na sobnoj temperaturi, reakciona smeša se razblaži i analizira na Luminex aparatu. Intenzitet signala sa svake mikrosfere poredi se

sa intenzitetom signala tri mikrosfere negativne kontrole, koje su uključene u pripremu mikrosfera kako bi se odredilo da li je mikrosfera pozitivna ili negativna na vezano antitelo. Faktor podešavanja pozadine (BAF) se oduzima od svake kombinacije antigen-specifične mikrosfere/kontrola da bi se dobile tri podešene vrednosti (*Adjusted Ratios*). Pozitivna vrednost za dve ili više od tri podešene vrednosti smatra se pozitivnom reakcijom za mikrosferu. Negativna vrednost za dve ili više od tri podešene vrednosti smatra se negativnom reakcijom.

Trombocitni unakrsni test

Interreakcija na doze trombocita izvedena je testom adhezije eritrocita u čvrstoj fazi u prisustvu specifičnih monoklonskih antitrombocitnih antitela tzv. MASPAT test (engl. *Monoclonal Antibody Solid-phase Platelet Antibody Test*). Ovim testom u čvrstoj fazi na mikropločama utvrđuje se podudaranje davočevih trombocita sa serumom bolesnika. Test je baziran na reakciji antigena i antitela.



Slika 4. Unakrsna reakcija na trombocite – MASPAT test

Postupak: Udubljenja mikroploče obložena su mišjim monoklonskim antitelima koja su specifična za trombocite. Trombociti davaoca dodaju se u udubljenja mikroploče. Centrifugiranjem mikroploče trombociti se zadrže i vežu u jednom sloju za antitela u

udubljenju. Pranjem se odstranjuje višak trombocita koji se nije vezao za udubljenja mikroploče. Po dodavanju seruma bolesnika koji ima antitrombocitna antitela, tokom perioda inkubacije od 30 min na 37 °C dolazi do vezivanja anti-trombocitnih antitela za sloj trombocita davaoca.

Reakcija vezivanja se ubrzava dodavanjem rastvora male jonske jačine i tresenjem mikroploče. Posle inkubacije, mikroploča se pere radi odstranjenja viška seruma i odmah dodaju anti-IgG reagens (mišja monoklonska anti human IgG antitela) i indikator eritrociti (koji imaju pojačanu osetljivost na humani IgG). Reakcija se očitava posle centrifugiranja mikroploče. Eritrociti čine sloj u vidu širokog prstena na dnu udubljenja mikroploče kod pozitivne reakcije ili se skupe u formaciju oblika dugmeta kod negativne reakcije. MASPAT kit, proizvođač Sanquin.

Utvrdjivanje ABO inkompatibilnosti

Imunoserološko ispitivanje bolesnika i doza trombocita koje su izazvale reakciju obuhvatalo je: proveru ABO krvne grupe i direktan anti-humani globulin test ID metodom na gel kartici iz uzorka bolesnikove krvi pre i posle transfuzijske reakcije. Iz uzorka plazme bolesnika urađen je skrining test na prisustvo anti-eritrocitnih antitela metodom indirektnog antiglobulinskog testa na gel kartici. Iz plazme doza trombocita (tj. plazmi davaoca) koje su izazvale reakciju rađena je provera krvne grupe ABO sistema (reverzni deo) i skrining antitela takođe ID metodom na gel kartici (BIORAD).

Mikrobiološka testiranja

Detektovanje prisustva mikroorganizama u uzorcima krvi bolesnika i u uzorcima jedinica trombocita koje su izazvale transfuzijske reakcije rađeno je korištenjem originalnih aerobnih i anaerobnih podloga BacT/ALERT FN Plus Anaerobic 40 ml, i BacT/ALERT PF Plus Aerobic Pediatric 30 ml, na aparatu BacT/ALERT 3D (bioMérieux, USA).

Proizvodnja pula trombocita u aditivnom rastvoru za trombocite

Aditivni rasvori za trombocite (*platelet additive solution, PAS*) su gotovi komercijalni rastvori namenjeni delimičnoj zameni plazme u pripremi i čuvanju koncentrata

trombocita iz «buffy-coat»-a ili doza trombocita dobivenih aferezom. Koriste se u preporučenim omerima: 70%-80% PAS / 20%-30% plazme, preostale u dozi trombocita. PAS SSP+ (MacoPharma) omogućava čuvanje trombocita na temperaturi od $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, 7 dana nakon sakupljanja.

Jedinice cele krvi centrifugiraju se na 3500 obrtaja/ 15 minuta za dobijanje trombocita iz Buffy Coat"-a. Doze BC ostavljaju se da dezagregiraju tokom noći, zatim se pravi pool trombocita iz 6 doza BC, centrifugiranjem na 1500 obrtaja 5 minuta. Dobijeni supernatant nad trombocitima se manuelno ili automatski odstrani a doliva PAS do količine od 200 ml.

Statistička analiza

Za analizu podataka korišćene se deskriptivne statističke metode, metode za testiranje hipoteza i metode za ocenu povezanosti. Od deskriptivnih metoda upotrebljeni su: grupisanje, tabeliranje, grafičko prikazivanje podataka, mere centralne tendencije (aritmetička sredina i medijana), mere varijabiliteta (standardna devijacija) i relativni brojevi iskazani u procentima.

Za ispitivanje normalnosti raspodele numeričkih varijabli korišćeni su statistički testovi Shapiro–Wilk i Kolmogorov–Smirnov. Vrednosti iskošenosti i zašiljenosti raspodele numeričkih obeležja posmatranja su razmotrene pre donošenja odluke o primeni parametarskih ili neparametarskih testova za ispitivanje razlike među grupama.

Ispitivanje razlike među grupama, u zavisnosti od broja ispitivanih grupa, vrste ispitivane varijable (numerička ili nominalna) i vrste uzoraka (zavisni ili nezavisni uzorci), korišćeni su: χ^2 test, Fisher-ov test, Student-ov t test (za zavisne i nezavisne uzorke), Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis-ov test, ANOVA, McNemar i Wilcoxon-ov test. Od metoda za ocenu značajnosti povezanosti upotrebljeni su koeficijenti korelacije (Pearson-ova parametarska korelacija ili Spearman-ova ne parametarska korelacija).

Univarijantna i multivarijantna logistička regresija korišćena je za procenu etioloških faktora za refrakternost na transfuzije trombocita. Varijable s verovatnoćom $p\leq 0.05$ u univarijantnoj analizi uvedene su u multivarijantne logističke regresione

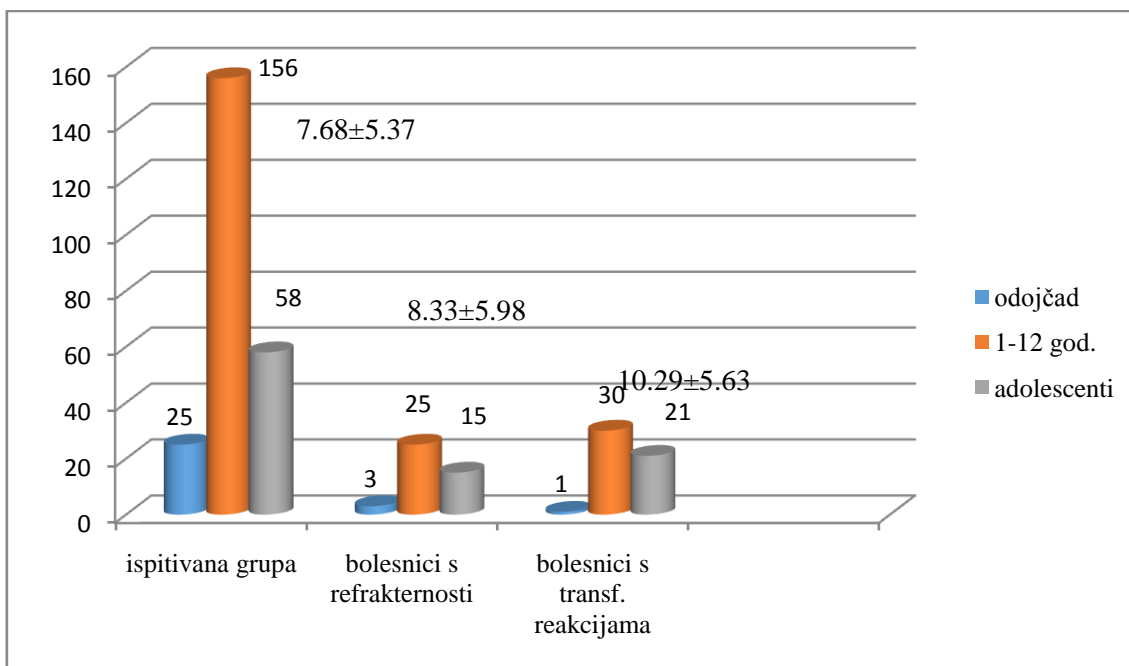
modele. Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti od 0.05. Statistička analiza podataka urađena je korišćenjem statističkog paketa SPSS.

REZULTATI RADA

Od ispitivanih 239 bolesnika 156 (65.3%) bilo je muškog pola, a 83 (34.7%) ženskog pola. Uzrast bolesnika kretalo se od 1.5 meseca do 18 godina, prosečna starost iznosila je 7.68 ± 5.37 .

Telesna visina ispitivanih bolesnika bila je od 58 cm do 192 cm, prosečna 125 ± 34.4 cm. Telesna masa iznosila je od 4 do 100 kg, prosečna telesna masa 32.4 ± 23.07 kg. Telesna površina ispitanika bila je u opsegu od 0.28 do 2.24 m², prosečna 1.02 ± 0.49 m².

Ispitivana grupa bolesnika stratifikovana je prema uzrastu u odojčad - od jednog meseca do godinu dana, decu od jedne do 12 godina, i adolescente – od 13 do 18 godina. Odojčadi je bilo 25 (10.5%), dece 156 (65.4%) i adolescenata 58 (24%), kao što je vidljivo iz Grafikona 1.



Grafikon 1. Uzrast ispitanika, bolesnika s refrakternosti i bolesnika sa reakcijama na transfuzije trombocita

A Rh (D) + pozitivnu krvnu grupu imalo je 78 bolesnika, O Rh (D) + 68, B Rh (D) + 38, AB Rh (D)+ 24 bolesnika. A Ø Rh(D) negativnu 14, O Rh(D) Ø 12, B Rh(D) Ø 4, i AB Rh(D) Ø samo jedan bolesnik, što je prikazano u Tabeli 1.

Tabela 1. Distribucija krvnih grupa ispitivanih bolesnika

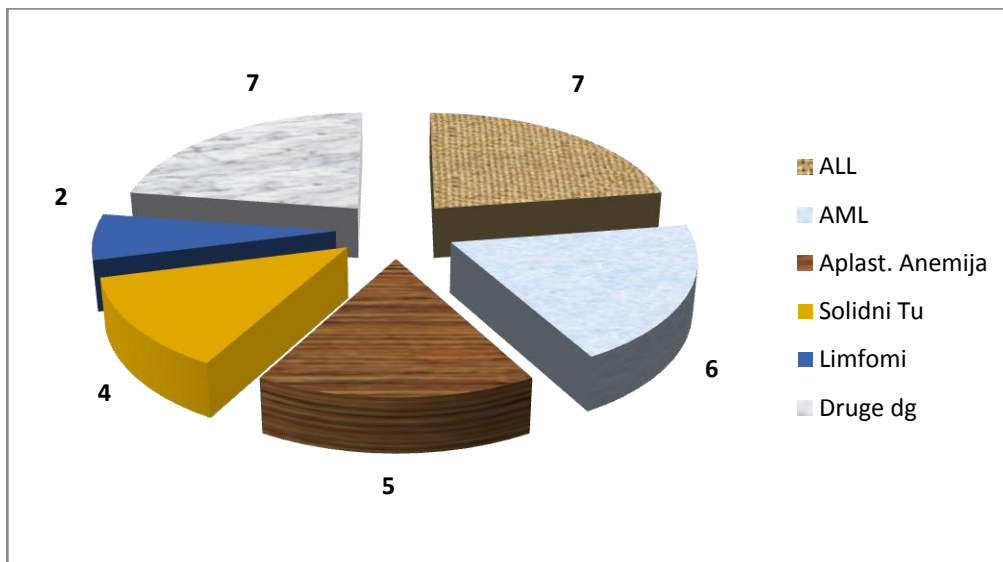
Krvna grupa	Broj bolesnika	Procenat
A+ pozitivna	78	32.6%
O+	68	28.5%
B+	38	15.9%
AB+	24	10.0%
A Ø negativna	14	5.9%
O Ø	12	5.0%
B Ø	4	1.7%
AB Ø	1	0.4%
Ukupno	239	100%

Po nalogu pedijatra kliničara bolesnici su u svrhu prevencije ili lečenja krvarenja zbog trombocitopenije i u svrhu preoperativne pripreme dobijali transfuzije trombocita. Broj trombocita u ispitivanih 239 bolesnika pre dobijanja transfuzije trombocita kretao se u opsegu od $1-59 \times 10^9/l$, prosečno $17.23 \pm 8.42 \times 10^9/l$. Posle dobijene transfuzije trombocita broj trombocita je iznosio $6.24 - 153 \times 10^9/l$, prosečno $49.44 \pm 25.69 \times 10^9/l$.

Porast korigovanog broja trombocita (KBT) za 24h kretao se od 0.22 do 51.05 $\times 10^9/l$, prosečno $12.74 \pm 9.83 \times 10^9/l$. Procenat oporavka trombocita (%OT) za 24h bio je prosečno $28.92 \pm 22.05\%$, tj. kretao se od 0.54 do 117.72%.

Pojava refrakternosti je posmatrana u odnosu na porast KBT. Refrakternost na transfuzije trombocita ispoljila se kod 43 (17.9%) bolesnika. Refrakternost je potvrđena kod 3 (7.0%) odojčadi, 25 (58.2%) dece uzrasta 1-12 godina i 15 (34.8%) adolescenata, po polu kod 30 dečaka i 13 devojčica. Prosečni uzrast bolesnika koji su razvili refrakternost na transfuzije trombocite bio je 8.33 ± 5.98 godina.

U grupi bolesnika koji su imali refrakternost na trombocite, 13 (30.2%) je lečeno od akutne leukemije, 5 (11.6%) od aplastične anemije, 4 (9.3%), od solidnih tumora, 2 od limfoma (4.6%) i 7 (16.3%) bolesnika od drugih dijagnoza što je vidljivo u Grafikonu 2.



Grafikon 2. Dijagnoze bolesnika u grupi refrakternih na transfuzije trombocita ALL akutna limfoblastna leukemija, AML akutna mijeloblastna leukemija.

Broj trombocita pre primanja transfuzija trombocita u grupi bolesnika koji su imali refrakternost na transfuzije trombocita iznosio je $3-25 \times 10^9/l$, prosečno 12.33 ± 6.50 ($p < 0.001$) a posle dobijanja terapije trombocitima $6.24-57 \times 10^9/l$, prosečno $21.99 \pm 12.22 \times 10^9/l$ ($p < 0.001$), što je bilo statistički značajno u odnosu na bolesnike koji nisu razvili refrakternost na transfuzije trombocita, prikazano u Tabeli 2.

Tabela 2. Odgovor bolesnika na transfuzije trombocita

Bolesnici	Br. Trombocita pre transfuzije rang / X $\times 10^9/l$	24h Br. Trombocita posle transfuzije rang / X $\times 10^9/l$	KBT 1h rang/X $\times 10^9/l$	%OT 1h	KBT 24h rang/X $\times 10^9/l$	%OT 24h
Sa	3-25	6.24-57	0-20.96	0-31.51	0.22-8.18	0.54.-24.15
refrakternosti	12.33 ± 6.50	21.9 ± 12.22	3.83 ± 5.13	8.72 ± 9.61	2.68 ± 1.86	(6.59 ± 5.36)
p < 0.001						

Bez	1-39	14-95	-	-	2.23-40.4	5.34-117.72
refrakternosti	15.92±6.86	44.26±18.13			12.71±8.64	31.17±21.7
					p<0.001	p<0.001

Porast KBT za 24h u grupi refrakternih bolesnika bio je značajno niži $0.22-8.18 \times 10^9/l$, prosečno $2.68 \pm 1.86 \times 10^9/l$ nego kod bolesnika bez refrakternosti, kretao se od 2.23 do $40.40 \times 10^9/l$, prosečno $12.71 \pm 8.64 \times 10^9/l$ ($p < 0.001$).

Procenat OT meren 24h od transfuzije trombocita u grupi bolesnika koji su razvili refrakternost takođe je bio značajno niži 0.54-24.15%, prosečno $6.59 \pm 5.36\%$ nego kod bolesnika bez refrakternosti, $31.17 \pm 21.70\%$ ($p < 0.001$).

Trideset dva (74.4%) bolesnika iz grupe refrakternih imalo je broj trombocita niži od $10 \times 10^9/l$. Broj trombocita je iznosio u proseku $4.02 \pm 2.72 \times 10^9/l$, što se nije značajno razlikovalo od broja trombocita u nerefrakternih bolesnika, broj trombocita $4.65 \pm 3.39 \times 10^9/l$.

Broja dana u kojima je broj trombocita bio niži od $10 \times 10^9/l$ u grupi refrakternih bolesnika iznosio je od 0 do 63 dana, prosečno 12.28 ± 12.86 dana dok je u grupi bolesnika bez refrakternosti iznosio od 0 do 8 dana, u proseku 1 ± 2 dana, što je statistički značajna razlika ($p < 0.001$).

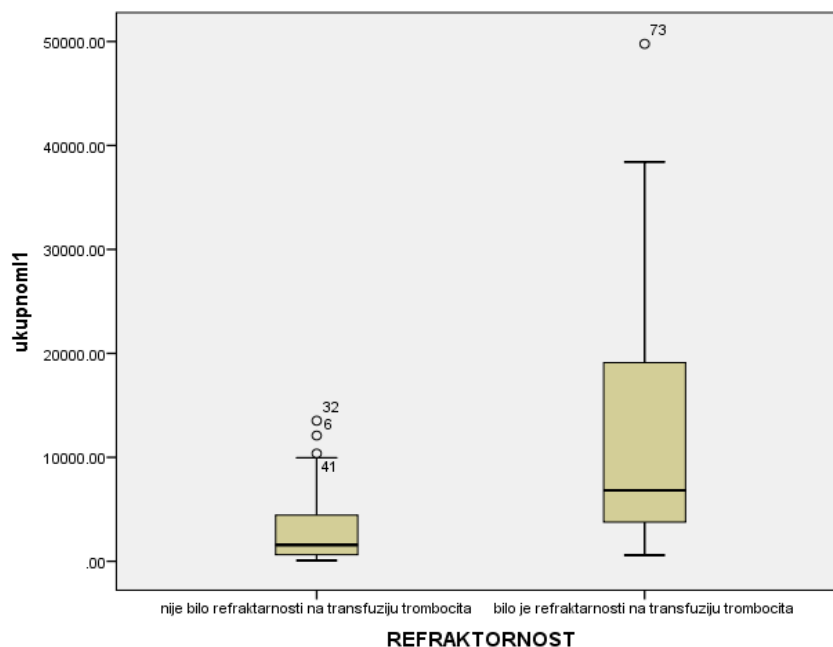
Ako posmatramo period u kojem su bolesnici imali trombocite niže od $10 \times 10^9/l$, i bolesnike podelimo u dve grupe: trombocitopenija $< 10 \times 10^9/l$ u trajanju do pet dana, i u trajanju pet dana i više, vidi se da se u grupi do pet dana nalazi 74.5% nerefrakternih bolesnika i svega 25.5% refrakternih bolesnika. U grupi trombocitopenija $< 10 \times 10^9/l$ u trajanju pet i više dana nalazi se 90.9% bolesnika koji su razvili refrakternost a samo 9.1% nerefrakternih bolesnika, što je statistički značajno ($p < 0.001$).

Porast KBT za 1h u grupi refrakternih bolesnika bio je $3.83 \pm 5.13 \times 10^9/l$ a procenat OT za 1h $8.72 \pm 9.61\%$.

U grupi bolesnika koji su razvili refrakternost na transfuzije trombocita 53.5% primalo je koncentrate trombocita iz buffy coata, 16.3% ozračene koncentrate iz buffy coata, 9.3% aferezne trombocite, 11.6%, aferezne ozračene trombocite, 7.0% filtrirane koncentrate trombocita i 2.3% pool trombocita. Sve doze trombocita bile su ABO podudarne.

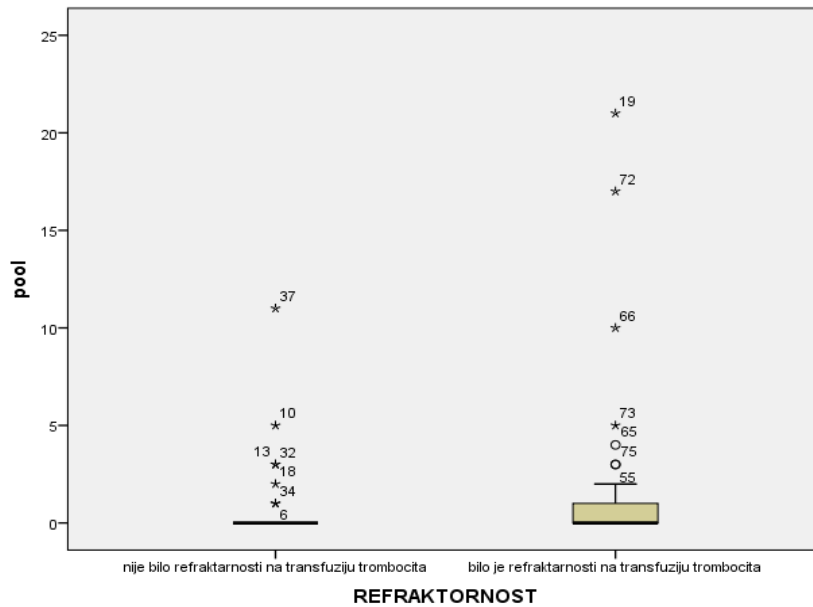
Broj doza trombocita 99.58 ± 128.08 i zapremina primenjenih trombocita 9814.90 ± 11136.67 ml u grupi bolesnika koja je razvila refrakternost bila je značajno

veća od broja njima primenjenih doza trombocita 33.36 ± 39.36 ($p < 0.001$), kao i od količine koju su dobili bolesnici koji nisu razvili refrakternost 3011.46 ± 3515.68 ml ($p < 0.001$), što je prikazano na Grafikonu 3.



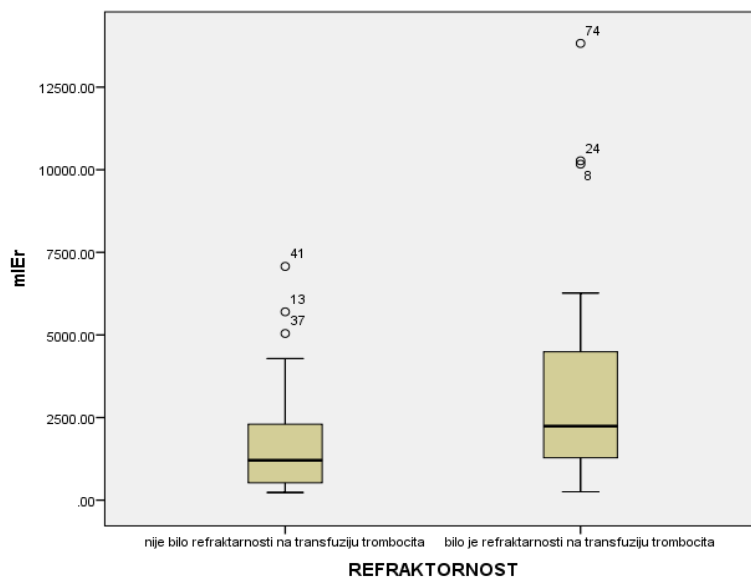
Grafikon 3. Količina primenjenih trombocitnih koncentrata u grupama bolesnika sa i bez ispoljene refrakternosti.

Broj primljenih polovina doza afereznog produkta u grupi refrakternih bolesnika bila je značajno viša 5.2 ± 16.0 nego u grupi bolesnika bez refrakternosti 0.41 ± 0.48 ($p < 0.001$). kao i u grupi refrakternih bolesnika koji su primali doze puliranih trombocita 1.78 ± 4.43 prema 0.3203 ± 0.090068 ($p = 0.018$) što se vidi u Grafikonu 4.



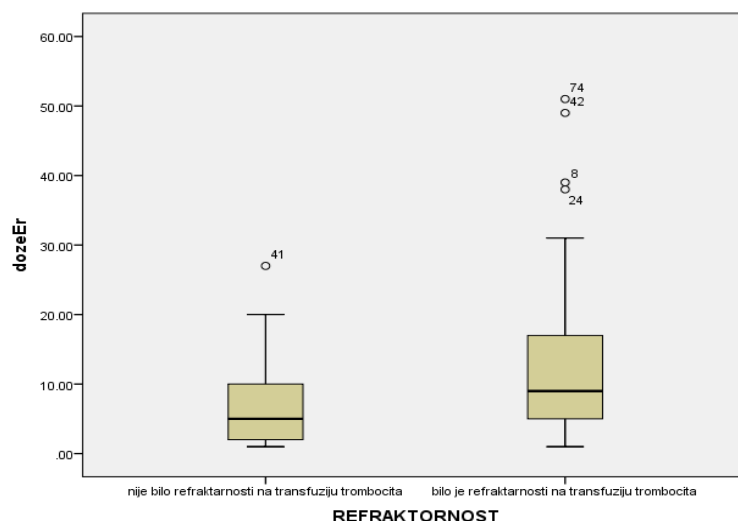
Grafikon 4. Razlika u broju primenjenih doza pulranih trombocita između u grupama bolesnika sa i bez ispoljene refrakternosti.

Količina primljenih eritrocita u mililitrima bila je značajno veća u grupi bolesnika koja je imala refrakternost na transfuzije trombocita 3269.78 ± 3150.30 ml nego kod bolesnika bez nje 1697.63 ± 1638.83 ml ($p=0.013$) što je prikazano u Grafikonu 5.



Grafikon 5. Razlika u količini primenjenih eritrocita u mililitrima između grupe bolesnika sa ispoljenom refrakternosti i grupe bolesnika bez refrakternosti.

Takođe, i broj primljenih doza eritrocita 14.27 ± 13.45 od strane bolesnika s razvijenom refrakternošću na transfuzije trombocita bio je značajno veći od doza eritrocita 6.97 ± 6.63 koje su primili bolesnici bez refrakternosti ($p=0.007$), vidi se u Grafikonu 6.



Grafikon 6. Razlika u broju primenjenih doza eritrocita između grupe bolesnika sa ispoljenom refrakternosti i grupe bez ispoljene refrakternosti.

Porast KBT i %OT značajno su se razlikovali za različite tipove trombocitnih koncentrata kod bolesnika koji su ispoljili refrakternost na transfuzije trombocita i onih bolesnika koji nisu bili refrakterni. Aferezni trombociti od pojedinačnog davaoca dali su najveći postransfuzioni porast KBT i %OT kod bolesnika koji su imali refrakternost, što je prikazano u Tabeli 3.

Tabela 3. Porast KBT i % Oporavka trombocita za različite trombocitne produkte

	KBT 24h	OT 24h	KBT 24h	OT 24h	KBT 24h	OT 24h
	BC Tr	BC Tr	aferezni Tr	aferezni	Tr Pool	Tr Pool
	rang / X	%	rang / X	Tr %	rang / X	%
	$\times 10^9/l$		$\times 10^9/l$		$\times 10^9/l$	
Sa	0.22-12.20	0.54-25.30	0-21.31	0-49.6	0-6.57	0-16.30
refrakternosti	2.71 ± 2.54	5.94 ± 5.50	5.48 ± 6.27	12.06 ± 13.19	3.42 ± 2.31	9.03 ± 6.06
Bez	2.23-33.83	4.24-69.57	0-31.10	0-70.15	1.18-15.5	3.12-75.1
refrakternosti	10.23 ± 6.38	25.28 ± 16.51	14.29 ± 8.46	33.91 ± 17.63	7.90 ± 6.38	30.03 ± 32.66
	P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.001	n.s.	n.s.

BC Tr koncentrat trombocita iz Buffy Coata, KBT korigovani broj Tr, %OT oporavka trombocita, Tr Pool pulirani BC koncentrat trombocita

U grupi ispitanika koji su primili manje od 20 doza trombocita bilo je 65.5% nerefrakternih bolesnika i 34.5% bolesnika koji su razvili refrakternost, u grupi ispitanika koji su primili 20-50 doza je 27.8% nerefrakternih i 72.2% bolesnika koji su imali refrakternost, dok su u grupi bolesnika koji su primili > 50 doza trombocita svi bolesnici bili refrakterni na transfuzije trombocita što je statistički značajno ($p < 0.001$).

Bolesnici sa refrakternosti primali su češće transfuzije trombocita te je interval između dobijenih doza bio kraći 4.74 ± 15.88 dana (od 0 do 90 dana), u odnosu na bolesnike koji nisu imali refrakternost i primali su transfuzije trombocita sa prosečnim razmakom 5.05 ± 6.20 dana (od 0 do 30 dana) ($p < 0.001$).

Transfuzijske reakcije ispoljile su se kod 13 bolesnika (30.2%) koji su razvili refraktarnost na transfuzije trombocita. Šestoro od njih (13.9%) imalo je alergijsku reakciju, troje FNHTR (6.97%), a četiri bolesnika (9.3%) imala su ponovljene reakcije: dve ponovljene alergijske reakcije, jednu ponovljenu FNHTR na trombocite a jedan bolesnik ponovljenu FNHTR ali na dozu eritrocita. Sva četiri bolesnika imala su imunu refrakternost. Utvrđeno je postojanje povezanosti između alergijskih transfuzijskih reakcija i refrakternosti kod bolesnika sa brojem trombocita nižim od $10 \times 10^9/l$ ($p < 0.001$). Sprovedenim ispitivanjima za antitrombocitna antitela utvrđena je etiologija refrakternosti. Kod 22 bolesnika (51.2%) nađeno je prisustvo antitela usmerenih na HLA ili HPA antigene na trombocitima kao uzrok refrakternosti, tj refrakternost je bila imunog porekla. Jedanaest bolesnika (50%) imalo je samo anti-HLA antitela, četvoro isključivo anti-HPA antitela (18.2%), a 7 (31.8%) bolesnika imalo je i anti- HLA i anti-HPA antitela, kao što je prikazano u Tabeli 4.

Tabela 4. Etiologija refrakternosti u odnosu na dijagnoze ispitivanih bolesnika

Dijagnoza	Total [br]	Etiologija [n]						
		anti- HLA +	anti- HPA +	anti- HLA+/HPA+	anti - HLA+/ Ne- imuna	anti- HPA+ / Ne- imuna	anti HLA+/HPA +/ Ne-immuna	Ne-imuna
Neuroblastoma	10	2		1	2	1	1	3
ALL	9				2	1		6
AML	4				1			3

AA	3	1	1	1	
MDS	3		1		2
JMML	2	1			1
SCID	2			1	1
HLH	2	1			1
TU testis	1				1
MH	1			1	
NHL-B	1				1
AM sec ALL	1		1		
FA	1		1		
Sy Evans	1			1	
Drugo	2				2

total number of patients [N]; anti-HLA antibody [HLA+]; anti-HPA antibody [HPA+]; Acute lymphoblastic leukemia ALL; acute myeloid leukemia AML; aplastic anaemia AA; myelodyslasia MD; juvenile myelomonocytic leukemia JMML; severe-combined-immunodeficiency SCID; Hemophagocytic lymphohistiocytosis HLH; Morbus Hodgkin MH; non-Hodgkin lymphoma NHL; Fanconi anemia FA.

Tri bolesnika imalo je IgM klasu antitrombocitnih antitela, šest IgG klasu, IgM i IgG klasu dva bolesnika. Kod četiri bolesnika deferencirana su anti-HPA antitela. Po jedno antitelo imala su tri bolesnika i to antitelo anti-GIIbIIIa, anti-GPIaIIa i anti-GPIb/IX. Jedan bolesnik imao je dva anti-HPA antitela anti-GPIIbIIIa i anti-GPIaIIa.

Prisustvo anti-HLA ($p < 0.001$) i anti-HPA antitela ($p < 0.001$) statistički je značajno bilo povezano sa pojavom refrakternosti. Petogodišnja kumulativna incidenca za anti-trombocitna antitela prikazana je u Tabeli 5.

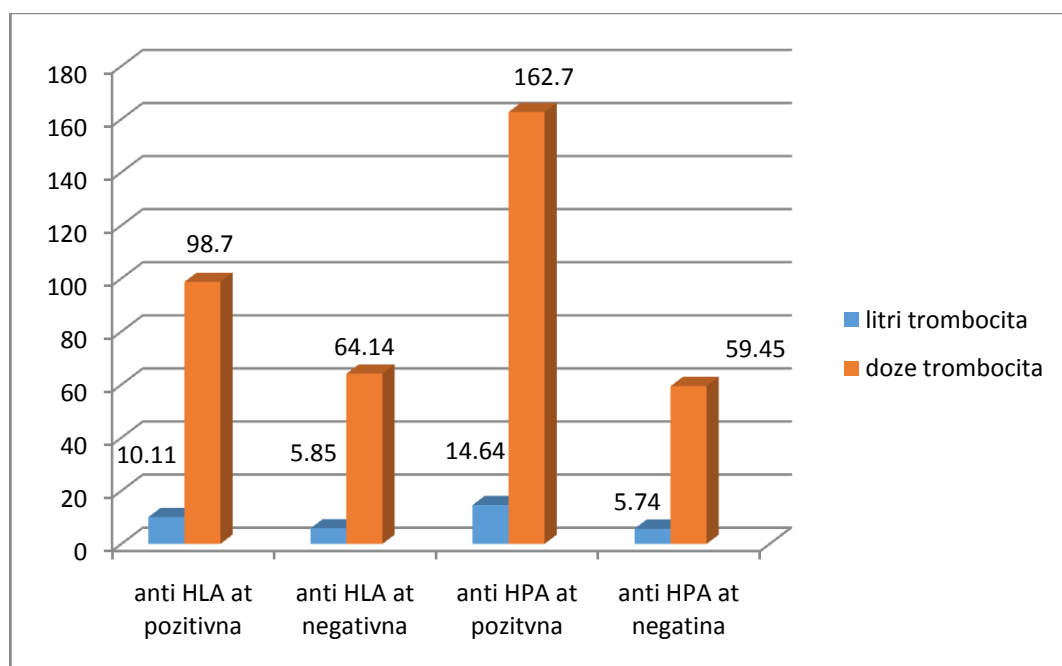
Tabela 5. Petogodišnja kumulativna incidenca anti-HLA i anti-HPA alloantitela kod bolesnika koji su dobijali trombocite

Petogodišnja incidenca	kumulativna	anti-HLA antitela	anti-HPA antitela	anti-HLA and anti- HPA antitela
Na 1000 jedinica transfundovanih Tr		0.0040	0.0013	0.0023
Na litar transfundovanog trombocitnog produkta ($\times 10^6$)		0.040	0.016	0.028

Nije postojala povezanost refrakternosti i markera inflamacije: CRP ($31.42 \pm 52.80 \text{ mg/l}$) i fibrinogena ($3.74 \pm 2.10 \text{ g/l}$), ali jeste refrakternosti i broja leukocita koji je bio značajno viši $6.65 \pm 10.52 \times 10^9/\text{l}$, prema $4.89 \pm 15.18 \times 10^9/\text{l}$, kod ne refrakternih bolesnika ($p=0.016$).

Elektrolitni status refrakternih bolesnika razlikovao se od ne refrakterni samo u visini kalijumovi iona. K^+ je bio $4.05 \pm 0.34 \text{ mmol/l}$ kod refraktarni a ne refrakterni bolesnika $3.75 \pm 0.49 \text{ mmol/l}$ ($p=0.005$). Takođe, i koncentracija albumina u serumu bila je značajno viša $41.87 \pm 5.08 \text{ g/l}$ kod refrakterni bolesnika od ne refrakterni $37.54 \pm 6.08 \text{ g/l}$. ($p=0.004$), dok se vrednost ukupni proteina $65.80 \pm 8.59 \text{ g/l}$ nije razlikovala.

Značajno veću količinu trombocita, 10113.41 ml su primili bolesnici koji su imali anti-HLA antitela u odnosu na bolesnike bez anti-HLA antitela 5851.66 ml . ($p=0.002$) Kod njih je takođe ukupan broj primenjenih doza koncentrata trombocita bio veći 98.70 , u odnosu na bolesnike koji nisu imali anti-HLA antitela 64.14 doza ($p=0.001$), prikazano u Grafikonu 7.



Grafikon 7. Potrošnja trombocita (l/doze) kod aloimunizovanih bolesnika na HLA ili HPA antigene

Bolesnici koji su imali anti-HPA antitela primili su značajno veću količinu trombocita u ml 14647.88 ml u odnosu na bolesnike bez anti-HPA antitela 5746.718

ml ($p=0.022$). Kod njih je takođe ukupan broj doza koncentrata trombocit bio veći 162.77, u poređenju s bolesnicima bez anti HPA antitela 59.45 ($p=0.025$), grafikon Nije postajala povezanost refrakternosti i primene Rh inkompatibilnih trombocita uz davanje Rh (D) IgG.

Kao rešenje problema refrakternosti, uzorci trombocita potencijalnih davalaca afereznih trombocita testirani su na podudarnost sa serumom primaoca trombocita. Maspat test interreakcije na trombocite rađen je za 11 bolesnika refrakternih na transfuzije trombocita, pri čemu je od 96 davalaca njih 39 (40.6%) identifikovano kao kompatibilni.

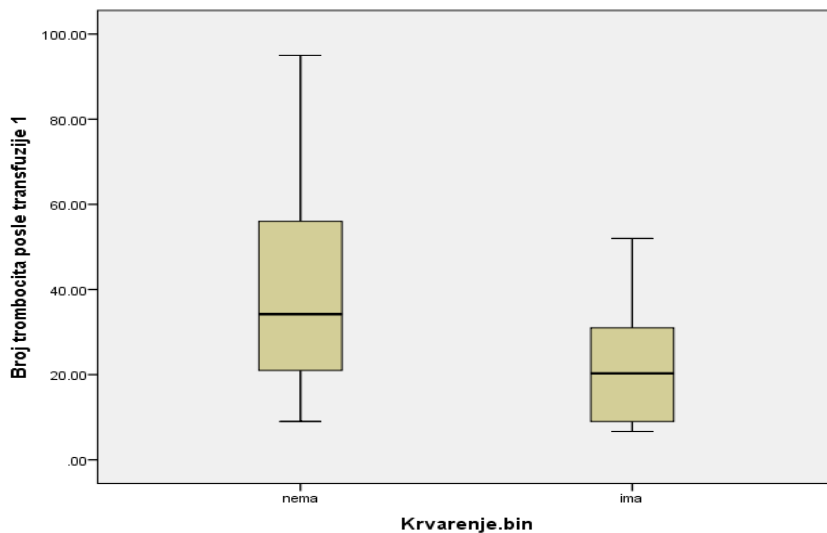
Za tri bolesnika sa anti HLA antitelima urađeno je 112 cross - match CDC analiza i pronađeno 36 (32.1%) kompatibilnih davalaca. Za bolesnika sa anti – HPA antitelima urađena je prvo HPA genotipizacija a potom je tražen odgovarajući davalac iz registra HPA tipiziranih davalaca Zavoda za transfuziju krvi Vojvodine. Nakon davanja doze trombocita sa negativnim CDC testom bolesniku sa anti - HLA antitelima došlo je do značajnog porasta KBT 1h 24.8, %OT 43.66% (kod primene doze trombocita sa CDC+ testom porast KBT iznosio je 2.78 a %OT 4.96%). Kod 21 bolesnika (48.8%) refrakternost je bila ne imunog porekla.

Od ne imunih razloga za refrakternost razmatrani su: krvarenje, splenomegalija, hepatomegalija, febrilnost, infekcija lokalna/sistemska, lekovi, DIK, mukozna oštećenja, dijareja, transfuzijske reakcije i GVHD/VOD kao postransplantacione komplikacije.

Statističku značajnost u povezanosti sa refrakternošću imali su: krvarenje ($p=0.025$), febrilnost ($p=0.038$), mukozna oštećenja ($p=0.045$), lekovi s dejstvom na trombocite $p=0.032$, dijareja ($p=0.002$), autologne transplantacije PMČH ($p=0.003$).

U grupi bolesnika sa refrakternosti na transfuzije trombocita, 13 bolesnika (30.2%) je imalo hemoragiju. Najčešće su bila kožna krvarenja u obliku petehija, ekhimoza i hematoma (50%), sledile su epistakse (41.6%). Jedan bolesnik je imao melenu, a jedan intrakranialno krvarenje (8.4%). Nije postojala povezanost između broja trombocita i krvarenja, jer 67% bolesnika refraktenih na transfuzije trombocita koji su imali broj trombocita niži od $10 \times 10^9/l$ nisu krvarili. Ako posmatramo broj trombocita bolesnika sa krvarenjem $11.83 \pm 6.99 \times 10^9/l$, on se pre primene transfuzija nije značajno razlikovao, u odnosu na bolesnike bez krvarenja $14.46 \pm 6.77 \times 10^9/l$.

Postransfuzijski porast broja trombocita, 24h od transfuzije trombocita, kod bolesnika sa krvarenjem $22.48 \pm 14.17 \times 10^9/l$ bio je značajno niži nego kod bolesnika bez krvarenja $37.97 \pm 20.00 \times 10^9/l$ ($p=0.002$), prikazano u Grafikonu 8.

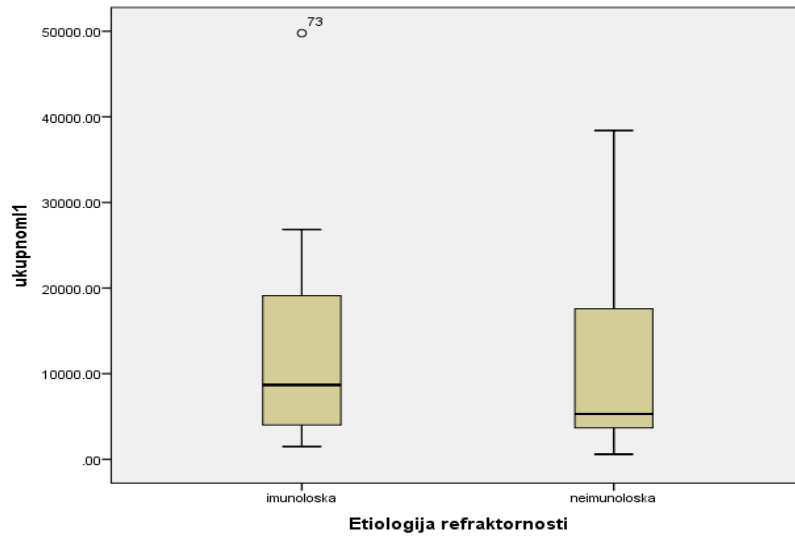


Grafikon 8. Broj trombocita posle primenjene transfuzije trombocita kod bolesnika sa i bez krvarenja.

Četrnaest bolesnika (32.5%) koji su razvili refrakternost na transfuzije trombocita bili su transplantirani, 10 je imalo autolognu transplantaciju perifernih matičnih ćelija hematopoeze cell (PMČH) a četvororo je imalo alogenu transplantaciju kostne srži. U grupi bolesnika sa razvijenom refrakternosti, četvororo je (9.8%) imalo je GvHD što je bio signifikantno više 5 (3.2%), nego u kontrolnoj grupi ($p=0.021$).

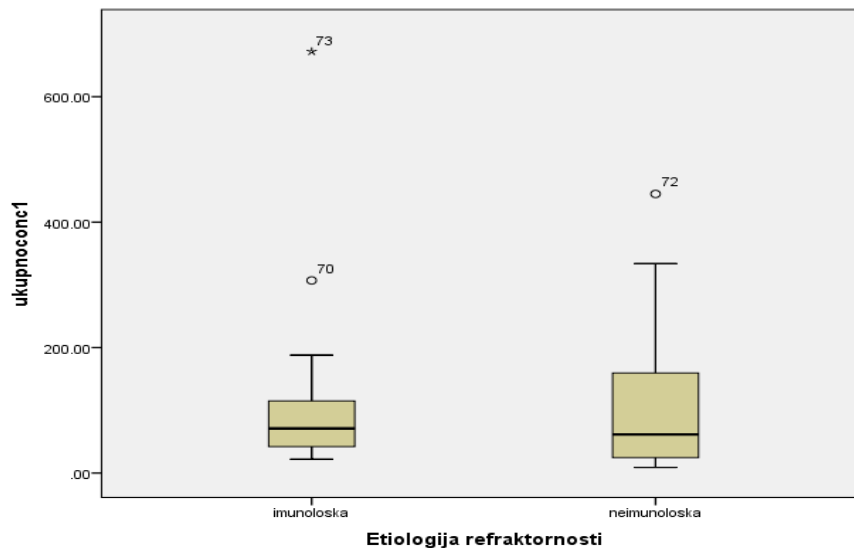
Zapažen je statistički značajno niži porast KBT nakon 24h kod bolesnika koji su primali ozračene doze trombocita 7.31 ± 9.27 od bolesnika koji su dobijali ne ozračene doze 9.29 ± 7.37 ($p=0.048$). Kod njih je takodje i %PT 24h bio niži, ali razlika nije bila statistički značajna. Kombinovana terapija citostaticima i ozračivanjem bolesnika predstavljala je značajan etiološki faktor za pojavu refrakternosti ($p=0.024$), ali ne sama hemioterapija.

Postojala je statistički značajna razlika u broju trombocita, trombocitni prag na koji je primenjena transfuzija trombocita kod bolesnika sa imunom $9.66 \pm 4.82 \times 10^9/l$ i ne imunom $15.12 \pm 6.94 \times 10^9/l$ ($p=0.011$). refrakternosti na transfuzije trombocita. Količina primljenih trombocita u mililitrima (ml) u grupi bolesnika sa imunom refrakternosti bila je znatno veća 12104.72 ± 11454.03 ml nego u grupi bolesnika sa ne imunom refrakternosti 7416.04 ± 10530.39 ml ($p=0.021$) što se vidi iz Grafikona 9.



Grafikon 9. Razlika u količini primljenih trombocita (ml) između grupe bolesnika sa imunom i grupe bolesnika sa neimunom refrakternosti na transfuzije trombocita.

Broj primljenih doza koncentrata trombocita iz buffy coata bio je značajno veći u grupi bolesnika sa imunom refrakternosti 119.13 ± 140.33 , u odnosu na grupu bolesnika sa neimunom refrakternosti na transfuzije trombocita 79.09 ± 113.63 ($p = 0.025$), Grafikon 10.



Grafikon 10. Razlika u količini primljenih doza trombocita iz BC između grupe bolesnika sa imunom i grupe bolesnika sa neimunom refrakternosti na transfuzije trombocita

Grupa bolesnika sa ne imunom refrakternosti razlikovala se u dužem TT vremenu 20.92 ± 6.05 s i nižem fibrinogenu 2.93 ± 1.38 g/l u odnosu na grupu s imunom refrakternosti $TT = 17.72 \pm 2.82$ s, ($p = 0.033$), fibrinogen 4.18 ± 2.31 g/l ($p = 0.047$).

Univarijantnom logističkom regresijom procenjeni su jedan po jedan mogući etiološki faktori koji dovode do refrakternosti na transfuzije trombocita. Faktori koji su pokazali statističku značajnost prikazali su u Tabeli 6. Potom su isti faktori uvršteni u multivarijantne regresione modele.

Odluka o izboru faktora koji će biti uključeni u pojedine modele donešena je na osnovu poznatih faktora rizika za pojavu refrakternosti koji su dobijeni prethodnim statističkim testiranjima u ovom ispitivanju. Multivarijantni regresioni model I činili su faktori: krvarenje, febrilnost, autologna transplantacija perifernih matičnih ćelija hematopoeze (PMČH), model II: alergijske transfuzijske reakcije, broj primljenih doza eritrocita, autologna transplantacija PMČH, i model III vrednosti serumskog albumina, kalijuma i dijareja, što je prikazano u Tabelama 7, 8 i 9.

Tabela 6. Univarijantna logistička regresiona analiza za refrakternost na transfuzije trombocita

	p	OR	95% CI
Broj trombocita pre transfuzije	0.020	3.386	0.858-0.987
Broj trombocita posle transfuzije	0.000	24.120	0.866-0.945
Duže od 5 dana sa trombocitima nižim od $10 \times 10^9/l$	0.000	29.167	5.921-143.682
Broj doza trombocita	0.000	1.080	1.034-1.127
Broj doza eritrocita	0.012	1.082	1.018-1.151
KPBT za BC trombocite	0.000	0.601	0.470-0.767
KPBT za aferezne trombocite	0.003	0.850	0.765-0.946
Febrilnost	0.027	3.095	1.137-8.426
Krvarenje	0.019	3.579	1.231-10.402
Alergijske transfuzijske reakcije	0.000	18.047	6.072-53.638

FNHTR	0.669	1.354	0.337-5.440
Terapija s dejstvom na trombocite	0.023	3.684	1.193-11.382
Albumin	0.028	1.107	1.011-1.211
K ioni	0.008	5.314	1.542-18.309
Dijareja	0.009	0.118	0.024-0.586
Autologna transplantacija PMČH	0.009	8.478	1.706-42.13

Tabela 7. Multivarijantna logistička regresiona analiza za refrakternost na transfuzije trombocita Model I

	P	OR	95% CI
Krvarenje	0.005	5.579	1.692-18.396
Autologna transplantacija PMČH	0.001	17.612	3.030-102.360
Febrilnost	0.038	3.061	1.075-12.064

Tabela 8. Multivarijantna logistička regresiona analiza za refrakternost na transfuzije trombocita Model II

	P	OR	95% CI
Doze eritrocita	0.010	1.127	1.029-1.234
Autologna transplantacija PMČH	0.004	20.820	2.680-161.73
Alergijska transfuzijska reakcija	0.000	18.888	4.304-82.895

Tabela 9. Multivarijantna logistička regresiona analiza za refrakternost na transfuzije trombocita Model III

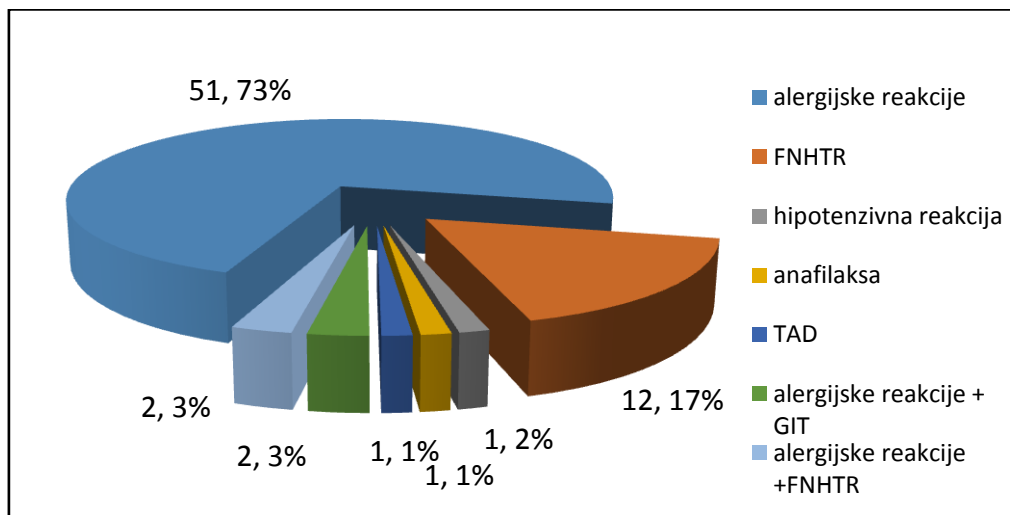
	P	OR	95% CI
Albumin	0.029	1.135	1.013-1.271

K+	0.046	4.187	1.023-17.148
dijareja	0.026	0.097	0.013-0.752

Neželjenu komplikaciju u toku ili posle primene transfuzije trombocitnog produkata u vidu 70 transfuzijskih reakcija imalo je 35 dečaka i 17 devojčica, ukupno 52 bolesnika (21.7%). Prosečne starosti 10.29 ± 5.6 godine. U starosnoj grupi od 1 meseca do godinu dana bio je samo 1 bolesnik (1.9%), u grupi od 1 do 12 godina 30 bolesnika (57.6%) a sa 13 i više godina 21 bolesnik (40.3%).

U najvećem broju ispoljile su se alergijske manifestacije transfuzijske reakcije 51 (72.8%), FNHTR 12 (17,1%) manifestacija, jedna hipotenzivna reakcija (1.1%), jedna anafilaksna, TAD, četiri reakcije (5.7%) sa kombinovanim simptomima: alergijska reakcijom sa simptomima od strane GIT - abdominalnim kolikama, alergijska reakcija sa mučninom i emezisom, dve alergijske sa FNHTR. Prva transfuzijska reakcija bila je po tipu najčešće alergijska 38, zatim FNHTR 8, te "drugih" reakcija 6.

Prikaz učestalosti transfuzijskih reakcija grafički dan je u Grafikonu 11.



Grafikon 11. Učestalost pojedinih tipova transfuzijskih reakcija

Ponavljane reakcije imalo je 11, (21.1%) bolesnika. U drugoj manifestaciji bilo je 11 reakcija na trombocite: 7 alergijskih, 3 FNHTR, jedan TAD (i dve FNHTR na

eritrocite). U trećoj manifestaciji transfuzijske reakcije bilo je četiri alergijske i jedna FNHTR reakcija a jedan bolesnik imao je i četvrtu i petu reakciju na transfuziju trombocita, koje su bile su alergijskog tipa. Sekundarni TAD imalo je 10 bolesnika, 19.3%.

Veći broj bolesnika imao je reakcije u toku primene transfuzije trombocita njih 59.6%, nego nakon završene transfuzije 40.4%. Prema verovatnoći povezanosti neželjenog događaja tj. ispoljenim simptomima reakcije i primene transfuzije trombocita najčešće je povezanost bila verovatna 76.6%, u 19.1% povezanost je bila sigurna a kod 4.3% bolesnika samo moguća. Prema težini kliničke slike koja se ispoljila, transfuzijske reakcije su najčešće bile blage 51.1%, srednje teške 36.2 % a teških je bilo najmanje, 12.8%.

Pojava neželjenih reakcija rasla je sa starijim uzrastom bolesnika. U grupi bolesnika staosti od 1 meseca do 1 godine 1.9% bolesnika je imalo transfuzijsku reakciju, u grupi 1-12 godina 57% bolesnika a u grupi starih 13 i više godina je 69% bolesnika ispoljilo reakciju na transfuziju trombocita.

Koncentrati trombocita iz BC izazvali su najveći broj reakcija 73.5%, od toga 59.2% je bilo ne ozračenih a 14.3% ozračenih koncentrata trombocita iz BC. Slede afrezn trombociti ne ozračeni 12.2%, aferezni ozračeni trombociti 10.2%, najmanje je bilo puliranih trombocita i filtriranih koncentrata trombocita po 2%.

Starost doza trombocita tj. vreme skladištenja do dana kada su doze primenjene i izazvale reakciju, najčešće je bio tri dana 33.3%, dva dana 27.5% i jedan dan 17.6%. Četvrti dan starosti imalo je 13.8% doza, a zadnji dan važenja imalo je 7.8% doza.

Transfuzijske reakcije u odnosu na dijagnoze oboljenja bolesnika koji su ih ispoljili prikazane su u Tabeli 10.

Tabela 10. Vrste transfuzijskih reakcija u odnosu na dijagnoze ispitivanih bolesnika

Dijagnoza	Total [br]	Vrsta transfuzijske reakcije [n]						
		Alergijske	FNHTR	Druge	TAD sec.	Ponovljene		
						Alergijske	FNHTR	TAD
ALL	29	14	3	3	3	5	3	1
ALL rec	2	1	1					
AML	12	4	1	2	2	5		

Neuroblastoma	7	4	1	1	2
NHL	4	3	1		
HL	1	anafilaksa		1	
AA	4	4		1	
MDS	1	1		1	
SA Ewing	3	2	1		
JMML	1		1		
HGB	1	1			
AM sec ALL	1	1			
APL	1	1			
FA	2		1		1
Rabdomio SA	2	1			1
TU testis	1	1		1	
TU Wilms	1	1			
CA hepatocelul	1		1		

Kumulativna incidencija svih neželjenih reakcija, alergijskih reakcija i FNHTR u odnosu na broj doza i u odnosu na količinu trombocitnih produkata za petogodišnji period prikazana je u Tabeli 11.

Tabela 11. Incidencije neželjenih transfuzijskih reakcija

Petogodišnja kumulativna incidenca	Transfuzijske reakcije ukupno	Alergijske reakcije	FNHTR
Na 1000 jedinica transfundovanih Tr	2.1	1.7	0.4
Na litar transfundovanog trombocitnog produkta	0.03	0.02	0.005

Poređenje rezultata biohemijskih testova između bolesnika koji su ispoljili refrakternost na transfuzije trombocita i bolesnika koji su imali neželjene reakcije na transfuzije trombocita prikazano je u Tabeli 12.

Tabela 12. Rezultati biohemijskih i koagulacijskih testova u grupi bolesnika koja je razvila refrakternost i grupi bolesnika s transfuzijskim reakcijama

Analiza	Bolesnici sa refrakternosti na transfuzije trombocita	Bolesnici sa reakcijama na transfuzije trombocita	P
K+	4.1±0.3 (3.5±4.8)	3.8±0.5 (2.6±4.6)	0.005
Na+	134.8±18.2 (3.2-128.3)	138.7±2.8 (131-146)	0.288

Cl-	101.2±3.4 (95-107)	100.8±3.1 (92-106)	0.522
P-	1.3±0.3 (0.41-1.88)	1.26±0.38 (0.36-1.90)	0.470
Bikarbonati	22.9±3.2 (13-27)	23.4±2.7 (18-28)	0.461
Ukupni proteini	65.8±8.6 (51-87)	61.5±9.4 (37-75)	0.065
Albumini	41.8±5.0 (34-51)	37.5±6.1 (23-50)	0.004
Bilirubin ukupni μmol/l	18.943±11.39 (5.60-58.30)	14.5±6.8 (4.4-31.1)	0.065
Bilirubin direktni	5.76± 5.68 (1.8±29.0)	4.6±2.2 (1.56-10.4)	0.395
AST IJ/ml	53.59±155.035 (7.0-901.0)	35.2±40.3 (9.00-243.0)	0.816
ALT IJ/ml	51.21±144.58 (6.0±832.0)	46.5±51.1 (4.0-256.0)	0.067
AST posle R IJ/ml	-	39.6±43.3 (8-203.0)	0.348
ALT posle R IJ/ml	-	46.5 ±44.6 (5-175)	0.044

Uporedni prikaz rezultata koagulacijskih testovu grupe bolesnika koji su razvili refrakternost na transfuzije trombocita i grupe bolesnika sa reakcijama na transfuziju trombocita dat je u Tabeli 13.

Tabela 13. Rezultati testova koagulacije grupe bolesnika sa refrakternosti na transfuzije trombocita i grupe bolesnika sa reakcijama na transfuzije trombocita.

Analiza	Bolesnici sa refrakternosti na transfuzije trombocita	Bolesnici sa reakcijama na transfuzije trombocita	p
PT (s)	73.6±20.8 s (14.5-111)	69.3±26.3 (12.3-111)	0.438
APTT (s)	28.6±5.2 s (17.3-45)	38.9±45.3 (18.4-300)	0.327
TT (s)	18.8±4.4 s (13.9-38.1)	24.6±44.2 (14-300)	0.173
Fibrinogen (g/l)	3.74±2.1 (1.1-12.6)	3.75±1.7 (0.43-11.5)	0.690
D-dimer (ng/ml)	3095.4±8936.6	1146.6±2351.0	0.635

	(98.9-34000)	(106-9633)	
vWF antigen (%)	230.42±198.34% (95.4±1000.0)	188.8±95.54 63.9-531.1	0.690

Vrednosti citokina IL-6 i IL-8 merene su u serumu bolesnika pre i posle transfuzijske reakcije. IL-6 pre reakcije bio je 32.88±14.53 pg/ml, (od 1.60 do 97.17 pg/ml) posle reakcije 110.41±61.07 pg/ml (od 3.31 do 487.60 pg/ml). Vrednost IL-8 pre reakcije bila je 47.96±24.43 pg/ml, (od 10.3 do 212.0 pg/ml), a posle reakcije 278.55±138.55 pg/ml (od 13.8 do 898.0 pg/ml).

Vrednosti IL-6 pre transfuzije nisu se značajno razlikovale među bolesnicima sa infekcijom 29.05±43.24 pg/ml, (od 2.60 pg/ml do 78.96 pg/ml) i bez nje 26.45±39.56 pg/ml (od 0.0 pg/ml do 97.17 pg/ml). IL-8 se nije značajno razlikovao kod pacijenata sa i bez infekcije, kako pre tako i posle transfuzije.

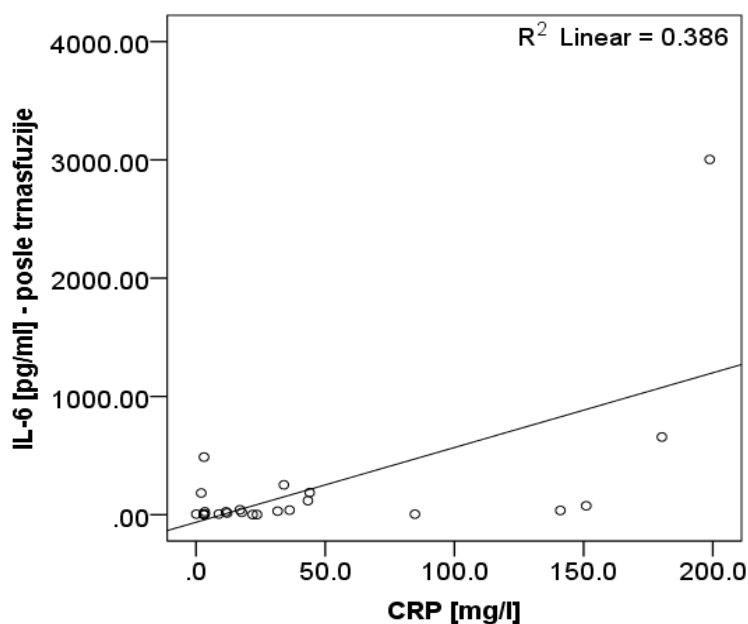
Značajno veće vrednosti IL-6 uočene su posle transfuzijske reakcije kod bolesnika koji su imali infekcije. 483.30±1041.79 pg/ml, (od 4.77 pg/ml do 3004.00 pg/ml), u odnosu na bolesnike bez infekcije 63.33±144.57 pg/ml (od 0.0 do 487.6 pg/ml) (p=0.020). Što je prikazano i u Tabeli 14.

Tabela 14. Vrednosti IL-6 i IL-8 pre i posle transfuzije kod bolesnika sa FNHTR

	IL-6 pg/ml	p	IL-8 pg/ml	p
Bolesnici pre transfuzijske reakcije	32.53±43.47		55.67±68.44	
Bolesnici posle transfuzijske reakcije (FNHTR)	94.17±164.73	0.252	123.0-183.17	0.244
Bolesnici bez infekcije pre transfuzije trombocita	26.45±39.56		8.82±24.20	
Bolesnici sa infekcijom pre transfuzije trombocita	29.05±43.24	0.732	83.97± 93.83	0.623
Bolesnici bez infekcije posle transfuzije trombocita s FNHTR	63.33±144.57		243.06±380.47	
Bolesnici bez infekcije posle transfuzije trombocita s FNHTR	483.30±1041.79	0.020	1223.61±2775.03	0.491
Afebrilni bolesnici pre transfuzije trombocita	3.27± 3.54		14.95±5.73	
Febrilni bolesnici pre transfuzije trombocita	51.20±42.87	0.032	66.71±66.86	0.073

Afebrilni bolesnici posle transfuzije trombocita sa FNHTR	10.28 ±13.79		137.67± 308.27	
Febrilni bolesnici posle transfuzije trombocita sa FNHTR	302.52±720.04	0.003	762.78± 1958.32	0.070

Postojala je pozitivna korelacija između vrednosti CRP i vrednosti IL-6 posle transfuzije trombocita 0.453, p= 0.023 (Grafikon 12.)



Grafikon 12. Korelacija vrednosti IL-6 sa vrednosti CRP

Vrednostima IL-6 posle transfuzijske reakcije korelirale su sa brojem neutrofila (p= 0.019) a sama korelacija bila je negativna -0.484 tj. sa smanjenjem broja neutrofila rasle su vrednosti IL-6 posle transfuzijske reakcije (Grafikon 13). Broj leukocita i limfocita nije korelirao sa vrednostima IL-6 i IL-8 pre i posle transfuzijske reakcije.

IL-8 je u dozama trombocita koje su izazvale reakcije iznosio od 4 do 2121.0 pg/ml u proseku 95.66 ± 319.10 pg/ml. što je blo statistički značajno više ($p=0.001$) odnosu na kontrolu grupu 4 pg/ml.

Nije bilo statistički značajne razlike u prosečnim vrednostima IL-6 326.88 ± 942.26 pg/ml. i IL-8 1068.43 ± 2616.66 pg/ml, kod bolesnika koji su primali ozračene produkte, u odnosu na one bolesnike koji su dobijali neozračene produkte IL-6 122.91 ± 191.94 pg/ml ($p=0.225$) i za IL-8 230.92 ± 278.76 pg/ml ($p=0.657$).

Alergijske transfuzijske reakcije češće su bile izazvane neozračenim dozama trombocita (71.8%) od ozračenih ($p=0.027$). Vrednosti D-Dimera bile su povišene kod 56.2% bolesnika sa alergijskim reakcijama, a samo kod 18.8% sa FNHTR ($p=0.017$).

Bolesnici koji su dobijali lekove sa dejstvom na trombocite (cefalosporinski antibiotici, antifugicidi), njih 58.8% nisu ispoljili reakcije na transfuzije trombocita, 23.5% imalo je alergijske reakcije ali nije bilo FNHTR. Bolesnici koji nisu primali terapiju koja ima kao mogući efekat sniženje broja trombocita, preostalih 41.2% bolesnika, imali su i alergijske reakcije (55.6%) i FNHTR (14.8%), ($p=0.015$)

Pozitivne hemokulture imalo je 13 bolesnika (16%), a hemokultura doze trombocita bila je pozitivna u četiri doze. Izolovani su sojevi bakterija: staphylococcus koagulasa negativan u tri doze trombocita i streptococcus u jednoj dozi. Nije bilo ispoljavanja pirogene reakcije kod tri bolesnika koji su primili ove doze trombocita, nego su sva tri bolesnika imala alergijske reakcije.

Povezanost antitela anti - HLA i anti - HPA i pojave transfuzijskih reakcija bila je sledeća: 81.8% bolesnika sa anti - HPA antitelima nisu ispoljili reakcije, a preostalih 9.1% bolesnika sa anti-HPA antitelima imali su alergijske reakcije ili različite ponovljene reakcije 9.1%, (ali nije bilo FNHTR) ($p=0.007$).

Anti - HLA antitela imalo je 27.8% bolesnika sa alergijskim reakcijama a samo 5.6% bolesnika sa FNHTR ($p=0.004$).

Bolesnici sa anti - HLA i anti - HPA antitelima nisu imali FNHTR a 14.3% bolesnika imalo je alergijsku reakciju ($p=0.004$).

Kod bolesnika sa ponovljenim transfuzijskim reakcijama, ako je prva reakcija bila alergijska 57.1% bolesnika ponovo je imalo alergijsku reakciju, ako je prva reakcija bila FNHTR 60% bolesnika je ponovo imalo FNHTR ($p=0.011$). Najteža klinička slika transfuzijske reakcije ispoljila se kod 50% bolesnika sa ponovljenim transfuzijskim reakcijama različitog tipa ($p=0.001$).

Povišena temperatura bolesnika tokom hospitalizacije češće je zapažena kod bolesnika sa alergijskim reakcijama (40%) nego FNHTR (17.8%) ($p=0.019$).

Dijareja se ispoljila podjednako kod FNHTR 8.3% i alergijske reakcije 8.3%, ali je najčešća bila kod bolesnika bez transfuzijskih reakcija 83.3%, ($p=0.002$).

DISKUSIJA

Praćenje neželjenih komplikacija transfuzijske terapije, pojave aloimunizacije i transfuzijskih reakcija u pedijatrijskoj populaciji predstavlja poseban izazov (133). Čak i kratkotrajno izlaganje krvnim komponentama može dovesti do štetnih sekvela sa

reperkusijom na ceo život. Stoga primena krvnih komponenti mora biti ciljana, racionalna, i striktno indikovana od lekara kliničara.

Prosečan broj trombocita na kojem su naši bolesnici primali transfuzije trombocita, tzv prag za primenu trombocita bio je $17.23 \pm 8.42 \times 10^9/l$. Prag za primanje transfuzija u grupi bolesnika sa refrakternosti na transfuzije trombocita bio je $12.33 \pm 6.50 \times 10^9/l$, a u grupi bolesnika sa transfuzijskim reakcijama $15.92 \pm 6.86 \times 10^9/l$, što je slično pragu za primenu trombocita kod pedijatrijskih onkoloških bolesnika u Liebermanovoj studiji, $16 \times 10^9/l$ ali sa boljim odgovorom kod naših bolesnika $48.70 \times 10^9/l$ nego u studiji Liebermana $24 \times 10^9/l$ (16).

Procenat terapijskih transfuzija trombocita u našoj ispitivanoj grupi bolesnika je 28,4%, tj. kod toliko bolesnika se ispoljilo krvarenje. Procenat primenjenih profilaksnih transfuzija trombocita našim bolesnicima bio je 71.6%, što je više u odnosu na podatke observacionih studija i randomizovanih kontrolisanih trajala za hematološke bolesnike s malignitetima (Kumara i sar.), gde je procenat profilaksnih transfuzija trombocita bio 18-66%, u proseku 43%. (18).

Najnovija studija Estcourta i sar. poredila je različite pragovne vrednosti broja trombocita za primenu profilaksnih transfuzija trombocita, smatrajući za standardni prag trombocitopeniju od $10 \times 10^9/l$. Studija favorizuje nizak prag trombocitopenije $5 \times 10^9/l$ kao indicaciju za primenu transfuzija trombocita jer nije dokazano da profilakšno davanje trombocita prevenira signifikantno krvarenje kod lumbalne punkcije, plasiranja venskih katetera i drugih hirurških procedura (20). Studija Zumberga i sar. (134) i Diedrichi i sar. (135) odnose se na bolesnike transplantirane PMČH i preporučuju primenu afereznih trombocitnih produkata samo kod pacijenata sa vidljivim krvarenjem.

Problem refrakternosti na transfuzije trombocita nedovoljno je obrađivan u pedijatrijskoj populaciji tako da su poređenja moguća u odnosu na adultnu populaciju. Kod odraslih refrakternost na transfuzije trombocita javlja se kod 27-50% bolesnika (136), a ne imuna refrakternost do 30% (137). U našoj dečijoj populaciji refrakternost na transfuzije trombocita ima manju ukupnu incidencu ali je učestalost ne immune refrakternosti veća.

Porast KBT nakon 1h i 24h pokazali su kao jasni determinatori imunske od ne imunske refrakternosti. Nijedan naš bolesnik sa imunom refrakternosti nije imao porast KBT >7.5 u prvom satu od transfuzije trombocita što je jasno ukazivalo na prisustvo

imunih aloantitela (anti-HLA/anti-HPA), koja odmah po primenjenoj transfuziji kupiraju i razaraju transfundovane trombocite davaoca, te nema odgovora na transfuzije trombocita. U prilog imunske refrakternosti govori porast KBT 1h nakon primenjene imunosupresivne terapije kod grupe bolesnika opisane u literaturi (138, 139).

Nizak porast KBT nakon 24h ukazivao je na neimunu refrakternost, gde loš odgovor na transfuziju trombocita nastaje zbog periferne potrošnje ili sekvestracije. U našoj ispitivanoj grupi najčešći razlog za loš odgovor na transfuzije trombocita bili su i neimuni etiološki faktori. Kod naši bolesnika statistički značajno sa refraktenosti na transfuzije trombocita bili su povezani febrilnost, krvarenje i terapija sa vankomicinom i amfotericinom B (140).

Rezultati naših ispitivanja su u saglasnosti sa radom Li i sar. koji je prikazao grupu od 69 bolesnika koji su razvili refrakternost na transfuzije trombocita posle transplantacije PMČH. Najčešći razlozi za refrakternost bili su takođe neimmune prirode: infekcije, krvarenje i febrilnost (141).

Pojava refrakternosti kod naših bolesnika statistički značajno je bila povezana sa brojem trombocita nižim od $10 \times 10^9/l$ koji je trajao više od 5 dana (u proseku 12.2 dana) ($p < 0.001$) i sa brojem doza primljenih trombocita većim od 50; ($p < 0.001$).

Neimuni etiološki faktori koji su pokazali značajnu povezanost s refraktenosti na transfuzije trombocita u našoj pedijatrijskoj populaciji, bili su gama ozračivanje trombocita (142) i mukozna oštećenja (143, 144, 145, 146, 147, 148), oni su takođe prepoznati kao uzročni faktori refrakternosti i u adultnoj populaciji.

Autologa transplantacija bila je signifikantni etiološki factor za refrakternost kod naših bolesnika ($p = 0.003$), takođe u grupi refrakternih bolesnika njih 12.2% imalo je GvHD ($p = 0.011$). Verujem da visoke doze hemostatske i radioterapije te imunosupresivna terapija u alogenoj transplantaciji kostne srži (BMT) može sniziti rizik za imunološki uzrokovanu refraktenost na transfuzije trombocita. Niskodozna hemioterapija kod autolognih transplantacija PMČH (urađena kod naših pedijatrijskih bolesnika), kao i režimi redukovano intenziteta kod alogenih transplantacija PMČH, ostavljaju imuni system još uvek potentnim da produkuje antitela zbog ponovljene ekspozicije na strane antigene (HLA or HPA) tokom potporne terapije višestrukim transfuzijama trombocita (149). I obrnuto, refrakternost na transfuzije trombocita koja je povezana sa HLA aloimunizacijom je faktor rizika za povećane potrebe u trombocitnim

transfuzijama, odloženo krvarenje i loš ishod nakon autologne transplantacije kod AML (150). Lapiere tvrdi da G-CSF – mobilizirana HSCT rezultuje u povećanoj incidenciji cirkulišućih anti-HLA antitela. G-CSF mobilizacija može imati “priming” efekat na B i učiniti ih ostljivijim za antigen-indukovanu aktivaciju (151).

GvHD je česta komplikacija nakon alogene HSCT. Incidencija srednje teškog do teškog akutnog GvHD je 30%-70% zavisno od stepena HLA podudarnosti i povezanosti donora i pacijenta. GvHD utiče na oporavak trombocita primarno smanjujući njihovo preživljavanje u perifernj krvi. Takođe, smanjena produkcija trombocita platelets može biti prisutna zbog graft-versus-stroma efekta. Studija preživljavanja trombocita je pokazala, da su oni kraće prisutni u cirkulaciji ako bolesnik ima GvHD. Razvoj GvHD i infekcija usporava engraftment trombocita (152). Porast incidence GvHD posle PBHSCT može dovesti do povećanja B-ćelijske aktivacije i/ili povećanog broja cirkulišućih B ćelija s porastom antitela kao odgovor, kada se poredi s BMT (151).

Pojava aloimunizacije i refrakternosti na HLA (7.5%) antigene u našoj hematološkoj grupi bolesnika ima manju učestalost u poređenju sa literaturnim podacima (153). U odnosu na frekvencu HPA alloimunizacije (4.6%), frekvencija je skoro slična niskoj učestalosti “0–4%” nađenoj u Evropskoj populaciji, nasuprot visokoj “20–26%” pronadenoj u azijskoj populaciji (154).

Mi smo uočili da posle primene HLA tipiziranih doza trombocita, dolazi do smanjenja PRA reaktivnost u CDC testu, i anti - HLA antitela postepeno nestaju kod bolesnika sa Langerhans Histiocitozom. Drugim rečima antitela na trombocite su tranzitorno prisutna. Hogge i saradnici našli su kod 37 bolesnika (24%) tranzitorna antitela, što može trajati nekoliko nedelja (155). Takođe više istraživača prijavilo je da su HLA antitela prisutna do 60 dana posle HSCT (156). Pojava refrakternosti na transfuzije trombocita u post-transplantacionom periodu uzrokovana anti-HLA antitelima primećena je kod bolesnika koji su dobijali kondicioni režim redukovane intenziteta. U Fasano studiji tri bolesnika koja su aloimunizovana pre transplantacije imala su prisutna anti - HLA antitela duže od 100 dana u posttransplantacionom periodu (149).

Ne možemo razlikovati karakteristike prisutnih anti-HLA antitela u vreme dijagnostikovanja refrakternosti, da li će biti prolazna ili stalna i životno ugrožavajuća antitela (157).

Nove kliničke studije pokazuju da čak do 30% bolesnika kojima je potrebna transplantacija mogu biti alosenzibilisani i razviti donor specifična anti-HLA antitela (DSA). Komplement vezujuća DSA mogu biti povezana sa lošim prihvatanjem kalema u HLA nepodudarnim HSCT (156).

U našem ispitivanju utvrđeno je postojanje povezanosti između alergijskih transfuzijskih reakcija i refrakternosti na transfuzije trombocita kod bolesnika sa brojem trombocita nižim od $10 \times 10^9/l$ ($p < 0.001$). Povezanost imunske refrakternosti i pojave transfuzijskih reakcija opisali su i drugi autori. Rebibo je prikazao podatak iz francuskog registra neželjenih reakcija kod primalaca transfuzija. Kod tri bolesnika sa alergijskim reakcijama identifikovana anti-trombocitna antitela, dva bolesnika su imala anti-HLA antitela a jedan anti-GPIIbIIIa antitelo. (158,159).

Tazzari je opisao slučaj gde su anti-HPA-5a aloantitela bila povezana sa FNHTR. Aferezna jedinica trombocita odgovorna za pojavu reakcije nije bila kontaminirana bakterijama, bolesnikove hemokulture su bile negativne i svi drugi uzroci FNHTR su bili isključeni. Usprkos niskoj frekvenci anti-HPA-5a antitela mogu biti uzrok FNHTR (160). U četiri bolesnika naše studije koji su imali ponavljane transfuzijske reakcije bilo alergijske ili FNHTR, pronađena su anti-HLA i/ili anti-HPA antitela.

Za antitrombocitna antitela i anti-HLA i anti-HPA zna se da osim što skraćuju preživljavanje transfundovanih trombocita, utiču na funkciju trombocita vršeći njihovu aktivaciju. Anti-HPA-1 antitela indukuju otpuštanje RANTES hemokina i pro-inflamatornih citokina koji su umešani u alergijske transfuzijske reakcije. Ukoliko su anti-HPA antitela bila prisutna kod donora, u dozi trombocita tokom skladištenja mogu povećati koncentraciju citokina produkovanih iz trombocita i dovesti do FNHTR (119,161).

Krvarenje se kod refrakternih bolesnika u adultnoj populaciji ispoljava kod njih 19%. Po Kerkhoffsu nizak porast KBT nakon 24h je senzitivni marker za pojavu krvarenja i povezan je sa nižim preživljavanjem bolesnika (37). U našoj grupi

refrakternih bolesnika krvarilo je njih 13 (30.2%), većina njih 84.6%, prema WHO skali za krvarenje (162) imalo je blaga krvarenja gradus I (7 bolesnika) i gradus II (4 bolesnika).

Nema dokaza da je potrebna profilaksna terapija trombocitima kod blagih krvarenja kod dece prema najnovijem vodiču za transfuziju trombocita - International Collaboration for Transfusion Medicine Guidelines (ICTMG). Broj trombocita koji predstavlja optimalan pristup za profilaksno davanje transfuzija trombocita prema istom vodiču je $10 \times 10^9/l$ i niže (163). Ovaj zaključak potvrđuju i naši bolesnici sa refrakternosti i brojem trombocita nižim od $10 \times 10^9/l$, od koji 67% nije krvarilo. Povezanost krvarenja i stanja refrakternosti na transfuzije trombocita potvrdio je značajno niži 24 časovni posttransfuzioni porast broja trombocita kod bolesnika sa krvarenjem u odnosu na bolesnike koji ne krvare.

Pronalaženje kompatibilne doze trombocita kod imunske refrakternosti obuhvata više imunoloških ispitivanja, koja su skupa i traju dugo, kao što je vidljivo i iz zbrinjavanja naših bolesnika kojima smo tražili odgovarajuće doze trombocita u *cross-match* CDC testu. Zbog toga je pokrenuta studija Trial to Reduce Alloimmunisation to platelet (TRAP), čiji zaključak je da: slaba i umerena anti – HLA antitela ne asociraju sa refrakternosti na trombocite, već samo visok nivo anti-HLA antitela (164.)

Potrebno je da stoga postoji pristup i strategija za prevenciju, dijagnostiku i zbrinjavanje imunske i ne imunske refrakternosti (165).

Pacijente sa imunom refrakternosti na transfuzije trombocita treba lečiti sa LCT CDC unakrsnim testom i Maspas testom negativnim dozama trombocita. Međutim, veoma je važno isključiti sve uzroke neimunske refrakternosti (izbegavajući lekove koji utiču na broj trombocita, lečeći krvarenje, mukozna oštećenja i febrilnost) da bi se ograničilo trošenje tipiziranih doza.

Aloimunizacija na trombocite učestalija je od aloimunizacije na eritrocite kod bolesnika koji su zavisni od transfuzija (talasemije, Diamond-Blackfan sindrom, i u slučajevima transplantacije kostne srži. Ti bolesnici su u povećanom riziku za trombocitnu refrakternost. Prevencija aloimunizacije na trombocite je leukodeplecija filtracijom, ona redukuje 71% refrakternosti na transfuzije trombocita (166).

Za bolju dijagnostiku aloimunizacije na trombocitne antigene neophodno je koristiti više različitih metoda testiranja anti-HLA i anti-HPA antitela, jer se ne mogu svi tipovi antitela (IgM, IgG) identifikovati jednom test procedurom.

Vulnerabilna dečija populacija češće reaguje transfuzijskim reakcijama na primenu krvnih komponenti (6.2 transfuzijske reakcije na 1000 transfuzija u pedijatrijskoj populaciji, a 2.4 u adultnoj). Pedijatrijski bolesnici imaju signifikantno višu incidencu transfuzijskih reakcija povezanih sa transfuzijom trombocita ($p < 0.001$) i eritrocita ($p = 0.001$) u odnosu na odrasle.

Prema Oakley i sar. incidenca alergijskih transfuzijskih reakcija u dece je 2.7/1000 u odnosu na adulte 1.1/1000 ($p < 0.001$), a FNHTR 1.9/1000 kod dece, u odraslih 0.47/1000 ($p < 0.001$) (29). Incidenca ozbiljnih transfuzijskih reakcija (HTR, TRALI, TACO) je manja je kod dece (0.32/1000) nego kod odraslih (0.51/1000) ali bez statističke značajnosti te se smatra da nema razlike između ovih populacija (75).

Naša petogodišnja kumulativna incidenca i za alergijske (1.7/1000) i za febrilne reakcije (0.4/1000) je približnija navedenim podacima za adultnu populaciju, što objašnjavamo velikim brojem neželjenih reakcija u grupi bolesnika starosti 13 i više godina, tj u populaciji adolescentnih bolesnika (41.1%). Nismo registrovali ozbiljnije transfuzijske reakcije (HTR, TRALI, TACO) tokom petogodišnjeg praćenja ispitanika.

U saglasnostima sa podacima iz literature je i polna pripadnost naših bolesnika koji su imali transfuzijske reakcije (67.8% dečaka). Dok je kod odraslih učestalost transfuzijskih reakcija po polu jednaka, Oakley je za dečiju populaciju utvrdio predominaciju muškog pola (7.9/1000 kod dečaka, a 4.3/1000 kod devojčica).

Kliničko ispoljavanje akutnih transfuzijskih reakcija kod pedijatrijskih bolesnika značajno se razlikuje od studije do studije, od odeljenja gde se podaci prikupljaju, od države do države. Transfuzijske reakcije u odeljenjima pedijatrijskih intenzivnih nega prikazali su Gauvin i sar. iz Kanade (60) kao i Li i sar. iz USA (167). Frekvencija akutnih alergijskih i FNHTR, reakcija po studijama je sledeća, u Gauvinovoj studiji je 15% alergijskih, 60% FNHTR, u Liovoj alergijskih 6.7%, FNHTR 12.5% za razliku od Karima i sar. iz Pakistana alergijskih reakcija 57.8%, FNHTR 35.5% i naše studije alergijskih reakcija 71.6% , FNHTR 16.2% (petogodišnje praćenje 2011-2015).

Razlike postoje i u frekvenci u istoj pedijatrijskoj populaciji bolesnika našeg Instituta (podaci petogodišnjeg praćenja 2001.-2005.) Veljković i sar. 42% FNHTR, 30% alergijske, 12% septične, i 16% nespecifičnih neposrednih transfuzijskih reakcija (168,169). Kaufman i sar. (170) u Platelet dose study (PLADO) studiji iznose varijaciju ekstremno širokog ranga u prijavljivanju FNHTR 0.09-27%. niske vrednosti objašnjavaju ne prijavljivanjem reakcije, jer se febrilnost klasifikuje u febrilnost uzrokovanu osnovnim obolenjem. Rezultati Coubana i sar. pokazuju da je u njihovoj ispitivanoj grupi od 66 dece učestalost FNHTR bila niža nego u adultnoj populaciji, i to objašnjavaju razlikom u volumenu doze i brzini infundovanja transfuzije između dece i odraslih, kao i sposobnosti dece da atenuiraju odgovor na proinflatorne citokine i posedovanje efektivnijih regulatornih mehanizama za proinflatorne stimulse (171). Karimova (77) i naša studija prezentuju podatke hematoonkoloških odeljenja na kojima je veća učestalost FNHTR i alergijskih reakcija, dok je u odeljenjima intenzivnih nega veća učestalost hipotenzije i posttransfuzijskih reakcija sa dispnejom: TRALI, TACO i TAD. Povećanje frekvence alergijskih reakcija kod hemaoloških bolesnika i bolesnika sa maligniteima Yanagisava i sar objašnjavaju imbalansom odnosa Th1/Th2 (povećanjem T2 help, a sniženjem T1 help ćelija) i pojavom imunološke disfunkcije. Češća pojava alergijskih reakcija u satrijem dečijem uzrastu objašnjava se potrebnim periodom senzibilizacije na određeni alergen, do pojave reakcije (172).

Povećana pojava alergijskih i FNHTR reakcija je posledica primene ne leukoredukovanih trombocitnih produkata. Primena *in line* fitracije u toku proizvodnje trombocita značajno smanjuje generaciju citokina u dozama trombocita tokom skladištenja i time doprinosi smanjenju transfuzijskih reakcija (173).

Maslanka i sar. iznose sledeće frekvence TAD 82%, TACO 6%, TRALI 12%. TAD predstavlja novi entitet. Jedna naša bolesnica imala je reakciju posle transfuzije trombocita sa značajnim padom saturacije pO₂, koja je zahtevala kiseoničku potporu te je svrstane u primarni TAD. Za razliku od primarnog TAD, pojava dispneje kao prateća pojava druge, osnovne reakcije, alergijske ili FNHTR oglašava je kao sekundarni TAD. (126). Prijavljivanje svih TAD u primarne gotovo je udvostručilo broj transfuzijskih reakcija u USA (167).

PLADO studija takođe je došla do zaključaka da izvor trombocita (aferezni ili iz BC), dužina skladištenja tj. starost doze i ABO status, nisu značajno povezani sa

pojavom bilo koje reakcije, dok je broj doza trombocita po transfuziji najznačajnija karakteristika koja asocira sa transfuzijskim reakcijama (170). U našem ispitivanju nije postojala asocijacija između transfuzijskih reakcija i starosti doze trombocita, ali takođe ni broja doza trombocita.

Kod naših bolesnika zapažen je veći broj alergijskih reakcija kod inicijalnih transfuzija, kada bolesnik prvi put prima trombocite i dobije reakciju, a kod narednih transfuzija reakcija se više ne ispoljava. Yanagisava i sar. primetili su da se teške urtkarijske reakcije javljaju najčešće u prvih pet primanja trombocitnih produkata. Takođe, da je česta pojava alergijske reakcije na prvu primenjenu dozu trombocita, naročito ako je to aferezni trombocitni produkt jer on sadrži dovoljnu količinu plazme (alergena) koja može indukovati reakciju (172). Pojava manjeg broja alergijskih reakcija kod ponavljanih transfuzija u PLADO studiji objašnjena je primenom pretransfuzijske medikacije kod narednih transfuzija trombocita, koja je efikasnija u prevenciji alergijskih reakcija nego FNHTR (170).

Plazma krvnih komponenti sadrži biološki aktivne supstance: citokine, komplement, histamin i lipide koji se akumuliraju tokom procesiranja i čuvanja krvnih komponenti i mogu biti odgovorne za različite neželjene transfuzijske reakcije. Transfuzije trombocita upoređuju se sa tušem citokina koji su odgovorni za većinu FNHTR posle transfuzije trombocita. Citokini uključeni u akutni inflamatorni odgovor: TNF- α , IL-1 β i IL-6 (tzv. proinflamatorni citokini) imaju potentnu pirogenu aktivnost. (93).

Ispitivanja vrednosti citokina IL-6 u našoj studiji u potpunosti su u saglasnost sa navedenim literaturnim postulatima. IL-6 je bio značajno viši posle ispoljene FNHTR kod onih bolesnika koji su prethodno imali infekciju. Postojala je pozitivna korelacija između IL-6 i CRP, i negativna između IL-6 i broja neutrofila. Povišene vrednosti rezultata CRP testa odgovaraju većoj upalnoj reakciji u organizmu bolesnika, što je praćeno i višim izmerenim vrednostima IL-6. Neutrofili sudeluju u odbrani organizma ćelijskom lizom i pri tome produkuju citokine. Degranulacijom neutrofila produkuje se IL-6 i raste njegova koncentracija.

Povezanost febrilnosti i IL-6 u našoj studiji uočena je dobijanjem značajne razlike u vrednostima IL-6 kod febrilnih i afebrilnih bolesnika. Značajan porast IL-6 nakon transfuzijske reakcije imali su i afebrilni i febrilni bolesnici. Vrednosti IL-6

febrilnih bolesnika pre transfuzijske reakcije bile su više od posttransfuzijskih vrednosti afebrilnih bolesnika. Posle transfuzijske reakcije vrednosti IL-6 kod febrilnih bolesnika porasle u šest puta.

Značaj određivanja proinflamatorni citokina kod bolesnika nije samo u potvrđi stanja inflamacije ili infekcije, nego je njihovo dugotrajno povišenje pokazatelj lošeg ishoda bolesti. Kod bolesnika sa akutnim respiratornim distres sindromom (ARDS) i sindromom multiple disfunkcije organa (MODS) određuje se nivo IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8. Povišenje citokina IL-2 >200 pg/ml, a vrednosti IL-1 β , IL-6, IL-8 > od 400 pg/ml u prvoj nedelji od postavljanja dijagnoze ARDS-a povezani su sa niskom verovatnoćom preživljavanja (174).

Određivanje IL-8 (neutrofilnog aktivirajućeg faktora i faktora hemotakse neutofila) u naših ispitivanih bolesnika potvrdilo je njegovu prediktivnu vrednost za ishod bolesti. Povezanost vrednosti IL-8 sa verovatnoćom preživljavanja za bolesnike s ARDS kako su zapazili Meduri i sar. postoji i između IL-8 i verovatnoće preživljavanja bolesnika sa hematoonkološkim oboljenjima (174).

Određivanje i praćenje nivoa citokina IL-6 i IL-8 u dozama trombocita tokom petodnevnog i sedmodnevnog skladištenja prikazano od strane Coste i sar. korišteno je kao mera kvaliteta trombocitnih koncentrata (175). Tokom celog perioda nije bilo značajnijeg porasta citokina. Maslanka i sar. nisu našli povezanost nivoa citokina bez obzira na starost krvne komponente sa razvojem posttransfuzijskih reakcija sa dispnejom (126).

Segatchian i sar. u komparativnoj analizi između BC trombocita i afereznih trombocita utvrdili su da je najviši nivo IL-6 i IL-8 u ranoj fazi skladištenja trombocita i da u narednih pet dana nema dodatnog povišenja interleukina. Sam proces kolekcije, stepen kontaminacije leukocitima i promene tokom skladištenja su faktori koji utiču na nivo interleukina koji će se naći u dozama trombocita prilikom izdavanja.

Vrednosti citokina IL-6 i IL-8 dobijene iz doza trombocita različite starosti u našem ispitivanju nisu se značajno razlikovale, što je u saglasnosti sa svim gore pomenutim literaturnim podacima (173).

Muyllle i saradnici su pokazali da transfuzijska reakcija može nastati nakon primene plazme koja je sadrži velike količine citokina. Pronađena je korelacija između

povišeng nivoa IL-6 u koncentratu trombocita i transfuzijske reakcije čime je potvrđeno da su citokini odgovorni za reakciju (176,177).

Reakcije koje se dešavaju nakon što je plazma odstranjena iz trombocitnog produkta tzv. rezidualne reakcije i dalje koreliraju sa IL-6 i podržavaju citokinsku teoriju da čak i niske vrednosti citokina mogu uzrokovati transfuzijsku reakciju u nekih bolesnika (178).

Serumski nivo IL-6 često je povišen pre pojave kliničkih simptoma i pre pozitivnosti rutinskih laboratorijskih testova npr. visoko-senzitivnog C reaktivnog proteina. Zbog kratkog poluživota vrednosti IL-6 se u serumu brzo menjaju te pored broja leukocita i prokalcitonina može biti dodatni pokazatelj u praćenju bolesnika sa sepsom. Prema Schefoldu, IL-6 može biti visoko senzitivno dijagnostičko oruđe za ranu identifikaciju sepse kod neonatusa i kod odraslih. Isto tako IL-6 se može koristiti za postavljanje dijagnoze septičkih transfuzijskih reakcija nastalih zbog bakterijske kontaminacije u trombocitnim koncentratima. Veličina kontaminacije može se odrediti pre rutinskih bakterioloških kultura detekcijom bakterijske DNA ili RNA u uzorcima trombocita sa brzim denzidometrijskim point-of-care IL-6 testom uz krevet bolesnika (za oko 20 minuta), što omogućava ranu ciljano-usmerenu terapiju (179).

Tri naša bolesnika koja su primila doze trombocita sa pozitivnim bakteriološkim kulturama nisu ispoljila septičku transfuzijsku reakciju već se reakcija manifestovala kao alergijski tip reakcije.

Interleukin IL-8 ima drugačiji uticaj na pojavu transfuzijske reakcije, jer je količina IL-8 prisutna u dozi trombocita dovoljna da uzrokuje reakciju kod bolesnika.

Povećanje količine IL-8 u plazmi trombocitnog koncentrata povezano je sa aktivacijom leukocita ili njihovom lizom (175). S transfuzijom povezane neželjene reakcije pripisuju se visokim nivoima IL-8. Gama zračenje može inhibirati akumulaciju IL-6 ali ne može prevenirati produkciju IL-8 tokom skladištenja nefiltriranih ozračenih doza trombocitnih koncentrata (180).

Predominantni etiološki mehanizam za FNHTR u našoj studiji je akumulacija citokina proizvedenih od strane leukocita tokom perioda skladištenja 96.2%. FNHTR uzrokovana anti-trombocitnim antitelima iznosi samo 3.8%. U literaturi je opisano da

anti-HPA-1 antitela indukuju otpuštanje proinflamatornog hemokina CCL5 RANTES sa trombocita koji je sudeluje u alergijskim transfuzijskim reakcijama. Prisustvo anti-HPA antitela povezano je samo sa alergijskim reakcijama kod naših bolesnika (119).

U našoj pedijatrijskoj studiji ispoljavanje FNHTR dešava se kada primenjena doza trombocita ima povišene vrednosti citokina a primalac ima bolest ili stanje povezano sa inflamatornim odgovorom. Naša studija je potvrdila dva mehanizma nastanka FNHTR. Etiopatogeneza FNHTR je različita zavisno da li je reakcija indukovana IL-6 ili IL-8. U našoj ispitivanoj pedijatrijskoj populaciji značajan udeo u etiologiji FNHTR predstavljaju faktori porekla bolesnika (senzitivnost, infekcija, inflamacija). Prema literaturnim podacima na incidencu FNHTR utiče i stepen metabolisanja citokina i prisustvo solubilnog IL-6 receptora kod primaoca. Interleukin IL-6 produkovan od primaoca ima dodatni efekat da zajedno sa IL-6 donora u dozi trombocita čini sumu količinu citokina IL-6 dovoljnu da izazove simptome i znake FNHTR (179).

Model alergijskih transfuzijskih reakcija (slično FNHTR) opisan je od strane Savage-a (100,181). Alergijske transfuzijske reakcije (ATR) rezultat su kombinacije primaočeve atopične predispozicije (hronične-genetske ili subakutne-stečene) i neophodnih plazma medijatora u krvnoj komponenti. Stepem primaočeve osetljivosti u vreme transfuzije i količina plazmatskih medijatora određuju težinu ATR (100, 181).

Primena premedikacije nema dokazanu efikasnost u alergijskim reakcijama i FNHTR (99). Signifikantni udeo u etiologiji FNHTR ima terapija lokalnih infekcija i inflamatornih žarišta u bolesnika. Redukovanje količine citokina u dozi trombocita redukuje i rizik za rekurentne transfuzijske reakcije. Leukodeplecija filtriranjem ne odstranjuje sve produkovane citokine od strane samih trombocita. Aditivni rastvor koji se dodaje na trombocite može oslabiti trombocitnu aktivaciju. Dodavanje magnezijuma i kalijumovih iona u komercijalne aditivne rastvore za trombocite PAS II i PAS III potpuno prevenira trombocitnu aktivaciju (182,183). Studija Kackera i saradnika koja je evaluirala koštanje i efektivnost aditivnog rastvora (PAS) za trombocite u prevenciji alergijskih transfuzijskih reakcija zaključila je da je upotreba PAS i finansijski i klinički u prednosti upoređujući dosadašnju praksu pranja trombocita (102).

Naš izbor metode za redukciju nivoa citokina u dozama trombocita je upotreba trombocita sa redukovanom plazmom i resuspendovanih u aditivnom rastvoru a na osnovu brojnih literaturnih podataka koji favorizuju primenu koncentrata trombocita u

aditivnom rastvoru i prkazuju njihovu prednost u kliničkoj primeni (184,185). Primenili smo trombocite u aditivnom rastvoru kod dvoje dece sa alergijskom reakcijom. Rezultati porasta KBT i %OT kod trombocitnih koncentrata u aditivnom rastvoru u su bili niži nego kod primene doza trombocita resuspendovanih u plazmi. To ukazuje na gubitak određenog broja trombocita u procesu proizvodnje i u skladu je s literaturim podacima (186,187), te se treba uzeti u obzir pri planiranju i doziranju transfuzija trombocita u aditivnom rastvoru bolesnicima. Evaluacija efektivnosti terapije sa trombocitima u aditivnom rastvoru je u praćenju.

ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata koji su dobijeni u ovom radu doneti su sledeći zaključci:

1. Pojava refrakternosti na transfuzije trombocita u našoj grupi pedijatrijskih hematoonkoloških bolesnika manje je česta u odnosu na literaturne podatke o

refrakternosti adultnih bolesnika. Refrakternost je najčešće bila posledica udruženih ne imunih i imunih etioloških faktora.

2. Aloantitela na trombocite stvorilo je 22 bolesnika (51.2%), koji su ispoljili refrakternost imunog porekla. Identifikovana su antitela usmerena na HLA ili HPA antigene. Jedanaest bolesnika (50%) imalo je samo anti-HLA antitela, četvero isključivo anti-HPA antitela (18.2%), a 7 (31.8%) bolesnika imalo je i anti- HLA i anti-HPA antitela.
3. U grupi bolesnika sa imunom refrakternosti statistički značajno su bili niži porast KBT i %OT, broj trombocita je duži broj dana bio ispod $10 \times 10^9/l$, bolesnici u primali veći broj transfuzija trombocita i u frekventnijem režimu.
4. Statistički značajni ne imuni etiološki faktori bili su: krvarenje $p=0.025$, febrilnost $p=0.038$, mukozna oštećenja $p=0.045$, lekovi s dejstvom na trombocite $p=0.032$, dijareja $p=0.002$, autologne transplantacije PMČH $p=0.003$
5. Zapažen je statistički značajno niži porast KBT nakon 24h kod bolesnika koji su primali ozračene doze trombocita 7.31 ± 9.27 od bolesnika koji su dobijali ne ozračene doze 9.29 ± 7.37 $p=0.048$. Kombinovana terapija citostaticima i ozračivanjem bolesnika predstavljala je značajan etiološki faktor za pojavu refrakternosti $p=0.024$.
6. Univarijantnom i multivarijannom regresionom analizom u etiološki značajne faktore za refrakternost na transfuzije trombocita uvršteni su i broj primenjenih jedinica trombocita $p=0.000$ i jedinica eritrocita $p=0.012$ te alergijske transfuzijske reakcije $p=0.009$ koje su imale i najveći značaj po regresioj analizi OR 8.478
7. Imunizovanim bolesnicima su LCT CDC i Maspat testom pronađeni su odgovarajući kompatibilni davaoci. Nakon primene kompatibilnih doza trombocita došlo je do poboljšanja KBT i %OT ali je odgovarajući odgovor na transfuzije trombocita zapažen po ukklanjanjem i ne imunih etioloških faktora.

8. U grupi refrakternih bilo je 13 bolesnika (30.2%) koji su krvarili. Najčešća su bila kožna krvarenja u vidu petehija i hematoma (50%), potom epistakse (41.6%) (WHO gradus I i II), a po jedan bolesnik imao je melenu i intrakranijalno krvarenje (8.4%). Nije bilo statističke značajnosti između broja trombocita i krvarenja.
9. Najčešće neželjene reakcije u dečijoj populaciji bile su alergijske reakcije. Kumulativna incidencija alergijskih reakcija u odnosu na broj jedinica trombocita za petogodišnji period je 0.17%. U odnosu na količinu trombocitnih koncentrata, kumulativna incidencija za petogodišnji period iznosi 0.002%.
10. Kumulativna incidencija FNHTR reakcija u odnosu na broj jedinica trombocita za petogodišnji period je 0.04%, U odnosu na količinu trombocitnih koncentrata, kumulativna incidencija za petogodišnji period iznosi 0.0005%.
11. IL-6 je bio značajno viši posle ispoljene FNHTR kod onih bolesnika koji su prethodno imali infekciju. Postojala je pozitivna korelacija između IL-6 i CRP, i negativna između IL-6 i broja neutrofila. Uočena je povezanost febrilnosti i IL-6.
12. IL-8 je u dozama trombocita koje su izazvale reakcije bio u proseku 95.66 ± 319.10 pg/ml. što je bilo statistički značajno više $p=0.001$ u odnosu na kontrolu grupu 4 pg/ml. Utvrđeno je postojanje povezanosti vrednosti IL8 i lošeg ishoda osnovnog oboljenja.
13. Kod dva bolesnika sa alergijskim reakcijama primenjeni su pulirani trombociti u aditivnom rastvoru. Rezultati porasta KBT i %OT su bili niži nego kod primene jedinica trombocita resuspendovanih u plazmi. To ukazuje na gubitak određenog broja trombocita u procesu proizvodnje i u skladu je s literaturim podacima, te se treba uzeti u obzir pri planiranju i doziranju transfuzija trombocita u aditivnom rastvoru bolesnicima.

L I T E R A T U R A

1. Brewer DB. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *Br J Haematol* 2006; 133: 251–258.
2. Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J. Platelets and the immune continuum *Nature* 2011; 11:264-274.
3. Kuter DJ. Milestones in understanding platelet production: a historical overview *Br J Haematol* 2014; 165:248–258.
4. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens – 2013. *Vox Sang.* 2014; 106: 93–102.
5. Santoso S, Tsuno NH. Progress and challenges in platelet serology. *ISBT Sci Series* 2015; (Suppl. 1):211-28.
6. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; 12:261–273.
7. Ouwehand WH, Stafford P, Gheveart C, Campbell K, Allen D. Smith G et al. Platelet immunology, present and future. *ISBT Science Series* 2006; 1(1):96–102.
8. Li C, Li J, Li Y, Lang S, Yougbare I, Guangheng Z, Pingguo C, and Heyu N. Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries. *Adv Hematol.* 2012; 2012:1-14.
9. Nørgaard M, Jensen A. Ø, Engebjerg M. C. et al., Longterm clinical outcomes of patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Danish population-based cohort study. *Blood.* 2011; 117(13):3514–3520

10. Scheuerer B, Ernst M, Durrbaum-Landmann I. et al. "The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood*. 2000; 95(4):1158–1166.
11. Yang H, Lang S, Zhai Z. et al. Fibrinogen is required for maintenance of platelet intracellular and cell-surface expression. *Blood*. 2009; 114(2):425–436.
12. Sahler J, Spinelli S, Phipps R, Blumberg N. CD40 ligand (CD154) involvement in platelet transfusion reactions. *Transfus Clin Biol* 2012; 19:98-103.
13. Stroncek FD, Rebutta P. Platelet transfusions. *Lancet* 2007; 370(9585):427-38.
14. Kramer PA, Ravi S, Chacko B, Johnson MS., Darley-Usmar VM. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: Implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox Biology* 2014; (2):206–210.
15. Sibrowski W, Barz D, Bugert P, Frey BM, Gassner C, Garritsen H et al. Cross-Sectional Guidelines for therapy with Blood Components and Plasma Derivatives *Transfus Med Hemother* 2009; 36:372-382.
16. Lieberman L, Liu Y, Portwine C, Barty RL, Heddle NM. An epidemiologic cohort study reviewing the practice of blood product transfusions among a population of pediatric oncology patients. *Transfusion* 2014; 54:2736-2744.
17. Stanworth S., Estcourt LJ, Llewelyn CA, Murphy MF, Wood EM. Impact of prophylactic platelet transfusions on bleeding events in patients with hematologic malignancies: a subgroup analysis of a randomized trial. *Transfusion* 2014; 54:2385-2393.

18. Kumar A, Mhasakr R, Grossman BJ, Kaufman RJ, Tobian AAR, Kleinman S. Platelet transfusion: a systematic review of the clinical evidence. *Transfusion* 2015; 55:1116-1127.
19. Astwood E, Vora A. Personal practice: How we manage the risk of bleeding and thrombosis in children and young adults with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2011; 152:505–511.
20. Estcourt LJ, Stanworth SJ, Murphy MF. Platelet transfusions for patients with haematological malignancies: who needs them? *Br J Haematol* 2011; 154:425–440.
21. Buhrkuhl DC. An update on platelet transfusion in hematooncology supportive care. *Transfusion* 2010; 50:2266-2276.
22. Habr B, Charpentier J, Champigneulle B, Dechartres A, Daviaud F, Geri G, et al. Platelet transfusions in cancer patients with hypoproliferative thrombocytopenia in the intensive care unit. *Ann Intensive Care* 2015; (5):46-23.
23. Kaufman RM, Djulbegovic B, Gernsheimer T, Kleinman S, Timmouth AT, Capocelli KE et al. Platelet Transfusion: A Clinical Practice Guideline From the AABB. *Annals of Internal Medicine* 2015; 162 (3):205-213. *Transfusion Medicine*,
24. Murphy MF, Brown M, Carrington P, Hall G, Jeffrey RR, Machin S, et al. Guidelines for the use of the platelet transfusions. *Br J Haematol*, 2003; 122:10–23.
25. Supportive therapy. In Nathan and Oski's. Editors. In *Hematology and Oncology of Infancy and Childhood*. Eighth edition. Saunders Philadelphia 2015. p.1140-1148.

26. Warner MA, Jia Q, Clifford L, Wilson G, Brown MJ, Hanson AC et al. Preoperative platelet transfusions and perioperative red blood cell requirements in patients with thrombocytopenia undergoing noncardiac surgery. *Transfusion* 2016; 56:682–690.
27. Rebullá P. In Vitro and in Vivo Properties of Various Types of Platelets. *Vox sang* 1998; 74 (Suppl.2):217-222.
28. Seheult JN, Triulzi DJ, Yazer MH. I am the 9%: Making the case for whole-blood platelets. *Transfus Med* 2016; doi: 10.1111/tme.12312.
29. Tynngård N. Preparation, storage and quality control of platelet concentrates *Transfus Apher Sci* 2009; (41):97–104.
30. van der Meer PF. Platelet concentrates, from whole blood or collected by apheresis? *Transfus Apher Sci* 2013; (48): 129–131.
31. Vassallo RR, Murphy S. A critical comparison of platelet preparation methods. *Current Opinion in Hematol.* 2006; 13:323–330.
32. Ringwald D, Haager B, Krex D, Zimmermann R, Strasser E, Antoon M, et al. Impact of different hold time before addition of platelet additive solution on the in vitro quality of apheresis platelets. *Transfusion* 2006; 46: 942-48.
33. Zhang JG, Carter CJ, Culibrk B, Devine DV, Levin E, Scammell K, et al. Buffy-coat platelet variables and metabolism during storage in additive solutions or plasma. *Transfusion* 2008; 48:847-56.
34. Sahler J, Grimshaw K, Spinelli SL, Refaai MA, Phipps RP, Blumberg N. Platelet storage and transfusions: New concerns associated with an old therapy. *Drug Discovery Today.* 2011; 8(1-2):9-13.

35. Maurer-Spurej E, Chipperfield K. Past and Future Approaches to Assess the Quality of Platelets for Transfusion. *Transfus Med Rev.* 2007; 21(4):295-306.
36. Picker SM, Tauszig ME, Gathof BS. Transfusion Cell quality of apheresis-derived platelets treated with riboflavin-ultraviolet light after resuspension in platelet additive solution. *Transfusion* 2012; (52)3:510–516.
37. Kerkhoffs JL, Eikenboom JC, van de Watering LM, van Wordragen-Vlaswinkel RJ, Wijermans PW, Brand A. The clinical impact of platelet refractoriness: correlation with bleeding and survival. *Transfusion* 2008; 48(9):1959-65.
38. Novotny VMJ. Prevention and management of Platelet Transfusion Refractoriness. *Vox sang* 1999; 76:1-13.
39. Delafior-Weiss E, Mintz PD. The Evaluation and Management of Platelet Refractoriness and Alloimmunization *Transfus Med Rev* 2000; 14(2): 180-196.
40. Apelseh TO, Hervig T, Bruserud O. Current practice and future directions for optimization of platelet transfusions in patients with severe therapy-induced cytopenia. *Blood Rev.* 2011; 25(3):113-22.
41. Schnaidt M, Northoff H, Wernet D. Frequency and specificity of platelet-specific alloantibodies in HLA-immunized haematologic-oncologic disorders. *Transfus Med* 1996; 6:111–114.
42. Legler TJ, Fischer I, Dittmann J, Simson G, Lynen R, Humpe A et al. Frequency and causes of refractoriness in multiply transfused patient *Annals of Hematol.* 1997, 74(4): 185–189.

43. Kiefel V, König C, Kroll H, Santoso S. Platelet alloantibodies in transfused patients *Transfusion*. 2001; 41:766-770.
44. Moncharmont P, Rigal D. Prevalence of platelet-specific antibodies in the recipients of platelet units with transfusion adverse event. *Transfusion Clinique et Biologique* 2012; (19): 333–337.
45. Tazzari PL, Bontadini A, Zamagni C, Ricci F, Fruet F, Iannelli S, et al. Febrile nonhaemolytic transfusion reaction caused by antibodies against human platelet antigen 5a. *Transfus Med*. 2005; 15:443–444.
46. Shaz BH, Hillyer CD. Residual risk of D alloimmunization: is it time to feel safe about platelets from D+ donors? *Transfusion*. 2011; 51:1132-1135.
47. Kitazawa J, Nollet K, Morioka H, Tanaka K, Inomata M, Kubuki Y et al. Non-D Rh antibodies appearing after apheresis platelet transfusion: stimulation by red cells or microparticles? *Vox Sang*. 2011; 100(4):395-400
48. Cid J, Carbassé G, Pereira A, Sanz C, Mazzara R, Escolar G, Lozano M. Platelet transfusions from D+ donors to D- patients: a 10-year follow-up study of 1014 patients. *Transfusion*. 2011; 51:1163-1169.
49. Weinstein R, Simard A, Ferschke J, Vauthrin M, Bailey JA, Greene M. Prospective surveillance of D– recipients of D+ apheresis platelets: alloimmunization against D is not detected. *Transfusion*. 2015; 55(6):1327-30.
50. O'Brien KL, Haspel R, Uhl L. Anti-D alloimmunization after D-incompatible platelet transfusions: a 14-year single-institution retrospective review *Transfusion*. 2014; 54:650-654.

51. Cid J, Lozano M, Ziman A, West KA, O'Brien KL, Murphy M, Wendel S, Vazquez A, Ortin X, Hervig TA, Delaney M, Flegel WA, Yazer MH. Low frequency of anti-D alloimmunization following D+ platelet transfusion: the Anti-D Alloimmunization after D-incompatible Platelet Transfusions (ADAPT) study. *Br J Haematol.* 2015; 168:598–603.
52. Cid J, Lozano M. Risk of Rh (D) alloimmunization after transfusion of platelets from D donors to D– recipients. *Transfusion.* 2005; 45:453.
53. Pedrosaa AK, Pintob FJ, Linsc LD, Deusd GM. Blood transfusion reactions in children: associated factors. *J Pediatr (Rio J).* 2013; 89:400-6.
54. Stainsby D, Jones H, Wells AW, Gibson B, Cohen H. Adverse outcomes of blood transfusion in children: analysis of UK reports to the serious hazards of transfusion scheme 1996–2005 *Br J Haematol.* 2008; 141:73–79.
55. Harrison E, Bolton P. Serious hazards of transfusion in children (SHOT) *Pediatr Anest* 2011; (21) 10–13.
56. Slonim AD, Joseph JG, Turenne WM, Sharangpani A, Luban NLC. Blood transfusions in children: a multi-institutional analysis of practices and complications. *Transfusion.* 2008; 48:73-80.
57. Tinegate H, Birchall J, Gray A, Haggas R, Massey E, Norfolk D, et al. Guideline on the investigation and management of acute transfusion reactions Prepared by the BCSH Blood Transfusion Task Force. *Br J Haematol.* 2012; 159:143-153.
58. Lavoie J. Blood transfusion risks and alternative strategies in pediatric patients. *Pediatr Anesth.* 2011; (21): 14–24

59. Brajević Vučićević Z, Ilinčić Lj, Gavrilović M, Milić S, Dimitrijević G. Postupak primene krvnih komponenti i transfuzijske reakcije - Nacionalni vodič Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu. Kuća štampe, Beograd, 2005.
60. Gauvin F, Lacroix J, Robillard P, Lapointe H, and Hume H. Acute transfusion reactions in the pediatric intensive care unit. *Transfusion*. 2006; 46:1899-1908.
61. Blumberg N, Refaai M, Heal J. ABO matching of platelet transfusions - "Start Making Sense""As we get older, and stop making sense..." - The Talking Heads (1984). *Blood Transfus* 2015; 13:347-50.
62. Sapatnekar S, Sharma G, Downes KA, Wiersma S, McGrath C, Yomtovian R. Acute Hemolytic Transfusion Reaction in a Pediatric Patient Following Transfusion of Apheresis Platelets *J Clin Aph* 2005;20:225–229
63. Duguid J K M, Minards J, Bolton-Maggs P H B. Incompatible plasma transfusions and haemolysis in children *BMJ* 1999; 318:176–177.
64. Karafin MS, Blagg L, Tobian AAR, King KE, Ness PM, Savage WJ. ABO Antibody Titers are not Predictive of Hemolytic Reactions Due to Plasma Incompatible Platelet Transfusions. *Transfusion*. 2012; 52(10):2087–2093.
65. Josephson CD, Castillejo MI, Grima K, Christopher D. H ABO-mismatched platelet transfusions: Strategies to mitigate patient exposure to naturally occurring hemolytic antibodies. *Transf Aph Sci* 2010; (42):83-88
66. Lapierre V, Mahe C, Aupe´rin A, Stambouli F, Oubouzar N, Tramalloni D, et all. Platelet Transfusion Containing ABO-Incompatible Plasma

and Hepatic Veno-occlusive Disease after Hematopoietic Transplantation in Young Children. *Transplantation* 2005; 80:314–319

67. Quillen K. Hemolysis from platelet transfusion: call to action for an underreported reaction. *Transfusion* 2012; 52:2072-2074.
68. Kang SJK, Lim YA, Baik SY. Comparison of ABO antibody titers on the basis of the antibody detection method used. *Ann Lab Med.* 2014; 34(4):300–306.
69. Landim CS, Gomes FCA, Zeza BM, Mendrone AJ, Dinardo CL. Prophylactic strategies for acute hemolysis secondary to plasma-incompatible platelet transfusions: correlation between qualitative hemolysin test and isohemagglutinin titration. *Rev Brasil Hematol Hemot.* 2015; 37(4):217-222
70. Josephson CD, Mullis NC, Van Denmark C, Hillzer CD. Significant numbers of apheresis-derived group O platelet units have "high-titer" anti-A/A, B: implications for transfusion policy. *Transfusion* 2004; 44:805-08.
71. Julmy F, Ammann RA, Taleghani BM, Fontana S, Hirt A, Leibundgut K. Transfusion efficacy of ABO major-mismatched platelets (PLTs) in children is inferior to that of ABO-identical PLTs. *Transfusion* 2009; 49:21-33.
72. Quillen K, Sheldon SL, Daniel-Johnson JA, Lee-Stroka A.H, Flegel WA. A practical strategy to reduce the risk of passive hemolysis by screening plateletpheresis donors for high-titer ABO antibodies. *Transfusion.* 2011; 51(1):92–96.

73. Cooling LL, Downs TA, Butch SH, Davenport RD. Anti-A and anti-B titers in pooled group O platelets are comparable to apheresis platelets. *Transfusion*. 2008; 48(10):2106–2113.
74. FontaineMJ, Mills AM, Weiss S, Hong WJ, VM, Goodnough LT. How we treat: risk mitigation for ABO-incompatible plasma in plateletpheresis products. *Transfusion* 2012; 52:2081-2085.
75. Oakley FD, Woods M, Arnold S, Young PP Transfusion reactions in pediatric compared with adult patients: a look at rate, reaction type, and associated products. *Transfusion*. 2015; 55:563–570.
76. Bakdash S, Yazer MH. What every physician should know about transfusion reactions. *CMAJ*. 2007; 177(2):141-147.
77. Karim F. Root cause analysis of non-infectious transfusion complications and the lessons learnt *Transf Apher Sci* 2014; (50)111-17.
78. de Rie MA, van der Plas-van Dalen CM, Engelfriet CP, von dem Borne AE: The serology of febrile transfusion reactions. *Vox Sang* 1985; 49:126–134.
79. Tanaka S, Hayashi T, Tani Y, Hirayama F. Removal by adsorbent beads of biological response modifiers released from platelets, accumulated during storage, and potentially associated with platelet transfusion reactions. *Transfusion*. 2010; 50(5):1096-105.
80. Lin JS, Tzeng CH, Hao TC, Hu HY, Ho YT, Lyou JY, et al. Cytokine release in febrile non-haemolytic red cell transfusion reactions *Vox Sang* 2002; 82:156–160.

81. Blumberg N, Gettings KF, Turner C, Heal JM, Phipps RP. An association of soluble CD40 ligand (CD154) with adverse reactions to platelet transfusions *Transfusion* 2006; 46:1813-1821.
82. Aloui C, Sut C, Prigent A, Fagan J, Cognasse F, Granados-Herbepin V. et al. Are polymorphisms of the immunoregulatory factor CD40LG implicated in acute transfusion reactions? *Sci Rep* 2014; 4:7239.
83. Phipps RP, Kaufman J, Blumberg N. Platelet derived CD154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion. *Lancet*. 2001; 357:2023.
84. Mueller MM, Henschler R, Seifried E. Clinical impact of leucocyte depletion – what is the evidence? *ISBT Science Series* 2008; 3:85-90.
85. Heddle NM. Pathophysiology of febrile nonhemolytic transfusion reactions. *Curr Opin Hematol* 1999; 6:420-426.
86. Henrichs KF, Howk N, Masel DS, Thayer M, Refaai MA, Kirkley SA, et al. Providing ABO-identical platelets and cryoprecipitate to (almost) all patients: Approach, logistics, and associated decreases in transfusion reaction and red blood cell alloimmunization incidence. *Transfusion*. 2012; 52:635–40.
87. Valsami S, Dimitroulis D, Gialeraki A, ChimonidouM, Politou M. Current trends in platelet transfusions practice: The role of ABO-RhD and human leukocyte antigen incompatibility. *Asian J Transfus Sci*. 2015; 9(2):117–123.
88. Cid J, Harm SK, Yazerb MH. Platelet Transfusion – the Art and Science of Compromise. *Transfus Med Hemoth* 2013; 40:160–171.
89. Tanaka S, Hayashi T, Tani Y, Hirayama F. Removal by adsorbent beads of biological response modifiers released from platelets, accumulated

during storage, and potentially associated with platelet transfusion reactions. *Transfusion*. 2010; 50(5):1096-105.

90. Tanaka S, Hayashi T, Tani Y, Hirayama F. Removal of biological response modifiers associated with platelet transfusion reactions by columns containing adsorption beads. *Transfusion*. 2014; 54:1790-1797.
91. Tanaka S, Hayashi T, Sugaya S, Osabe M, Ueno Y, Tani Y, Hirayama F. A hollow-fibre column system to effectively prepare washed platelets. *Vox Sang*. 2015; 2547:1-10.
92. Palmer DS, Aye MT, Dumont L, Dumont D, McCombie N, Giulivi A, Rutherford B, Trudel E, Hashemi-Tavoullaris S. Prevention of cytokine accumulation in platelets obtained with the COBE spectra apheresis system. *Vox Sang*. 1998; 75(2):115-23.
93. Hyllner M. Prestorage leucocyte filtration of blood: effects on cytokine generation and complement activation. *Cur Anaesth Crit Care* 2004; 15:95–100.
94. Da Ponte A, Bidoli E, Talamini R, Steffan A, Abbruzzese L, Toffola RT, et al. Pre-storage leucocyte depletion and transfusion reaction rates in cancer patients. *Transfus Med*. 2005; 15(1):37-43.
95. Tauszig ME, Picker SM, Gathof BS. Platelet derived cytokine accumulation in platelet concentrates treated for pathogen reduction. *Transfus Apher Sci*. 2012; 46(1):33-7.
96. Coarash L. The hemostatic efficacy of platelet components prepared with pathogen inactivation. *Transfusion*. 2011; 51:1355-1356.

97. Hirayama F. Current understanding of allergic transfusion reactions: incidence, pathogenesis, laboratory tests, prevention and treatment *Br J Hematol* 2013; 160(4):434-444.
98. Savage WJ, AAR Tobian, Savage JH, Wood RA, Schroeder JT, Ness PM. Scratching the surface of allergic transfusion reactions. *Transfusion*. 2013; 53(6):1361-71.
99. Geiger TL, Howard SC. Acetaminophen and Diphenhydramine Premedication for Allergic and Febrile Nonhemolytic Transfusion Reactions: Good Prophylaxis or Bad Practice? *Transf Med Rev* 2007; 21(1):1–12.
100. Savage WJ. Hamilton RG, Tobian AAR. Milne GL, Kaufman RM. Defining risk factors and presentations of allergic reactions to platelet transfusion. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 133(6):1772-75.
101. Klüter H, Bubel S, Kirchner H, Wilhelm D. Febrile and allergic transfusion reactions after the transfusion of white cell-poor platelet preparations. *Transfusion*. 1999; 11:1179-1184.
102. Kacker S, Ness PM, Savage WJ, Frick KD, McCullough J, King KE, and all. The cost-effectiveness of platelet additive solution to prevent allergic transfusion reactions. *Transfusion*. 2013; 53(11):2609–2618.
103. Tobian AAR, Fuller AK, Ugluk K, Tisch DJ, Borge PD, Benjamin RJ. The impact of platelet additive solution apheresis platelets on allergic transfusion reactions and corrected count increment. *Transfusion*. 2014; 54(6): 1523–1529.

104. Knezevic Maramica I. Septic Transfusion Reactions. In Transfusion Medicine and Hemostasis: Clinical and Laboratory Aspects. Shaz B, Hillyer C, Roshal M, Abrams C. Editors. Second Edition. Elsevier Science, London 2013. p.421-426.
105. Reddy R, Pathania S, Kapil A, Bakhshi S. Review of spectrum and sensitivity of bacterial bloodstream isolates in children with malignancy: A retrospective analysis from a single center. Indian J Cancer 2014; 51(4):425-427.
106. Eder AF, Goldman M. How do I investigate septic transfusion reactions and blood donors with culture-positive platelet donations? Transfusion. 2011; 51:1662-1668.
107. Public Health Agency of Canada Guideline for investigation of suspected transmitted bacterial contamination. CCDR. 2008; 34(11):1-8.
108. Kleinman S, Dumont LJ, Tomasulo P et al. The impact of discontinuation of 7-day storage of apheresis platelet (PASSPORT) on recipient safety: an illustration of the need for proper risk assessments. Transfusion. 2009; 49:903–912.
109. Müller B, Walther-Wenke G, Kalus M, Alt T, Bux J, Zeiler T, Schottstedt V. Routine bacterial screening of platelet concentrates by flow cytometry and its impact on product safety and supply. Vox Sang. 2015; 108:209–218.
110. Smith D, Heaton WA, Zantek ND, Good CE, PGD Study Group. Detection of bacterial contamination in prestorage, culture-negative apheresis platelets on day of issue with the Pan Genera Detection test. Transfusion. 2011; 51:2573–2582.

111. Skvarc M, Stubljar D, Rogina P, Kaasch AJ. Non-culture-based diagnosis of bloodstream infection *Eur J Microbiol Immunol* 2013; (3)2:97–104.
112. Warhurst G, Dunn G, Chadwick P, Blackwood B, McAuley D, Perkins GD, et al. Rapid detection of health-care-associated bloodstream infection in critical care using multipathogen real-time polymerase chain reaction technology: a diagnostic accuracy study and systematic review. *Health Technol Assess*. 2015; 19(35):1-142
113. Blajchman MA, Beckers EAM, Dickmeiss E, Lin L, Moore G, Muylle L. Bacterial. Detection of Platelets: Current Problems and Possible Resolutions. *Transfus Med Rev*. 2005; 19(4):259-272.
114. Abedi MR, Doverud AC. Preparation and pathogen inactivation of double dose buffy coat platelet products using the INTERCEPT blood system. *J Vis Exp*. 2012; 7(70): e4414.
115. Popovsky MA. Transfusion-related acute lung injury: three decades of progress but miles to go before we sleep. *Transfusion*. 2015; 55:930–934.
116. Klein HG, Anstee DJ. Some unfavourable effects of transfusion. In *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 12th Edition. Klein HG, Anstee DJ. Editors, Blackwell Publishing, Oxford, 2005. p 666-701.
117. Mulder HD, Augustijn QJJ, vanWoensel JB, Bos AP, Juffermans NP, Wösten-van Asperen RM. Incidence, risk factors, and outcome of transfusion-related acute lung injury in critically ill children: A retrospective study. *J Crit Care* 2015; (30):55–59

118. Lieberman L, Petraszko T, Yi Q, Hannach B, Skeate R. Transfusion-related lung injury in children: a case series and review of the literature. *Transfusion*. 2014; 54:57-64.
119. Kjeldsen-Kragh J. Challenges in testing for platelet-related adverse events. *ISBT Science Series* 2011; 6:124-128.
120. Shaz BH, Stowell SR, Hillyer CD. Transfusion-related acute lung injury: from bedside to bench and back. *Blood*. 2011; 117(5):1463-1471.
121. Middelburg RA, van der Bom JG. Transfusion-related acute lung injury not a two-hit, but a multicausal model. *Transfusion*. 2015; 55(5):953-960.
122. Reesink HW, Lee J, Keller A, Dennington P, Pink J, Holdsworth R, et al. Measures to prevent transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Vox Sang* 2012; 103:231–259.
123. Popovsky M, Robillard P, Schipperus M, Stainsby D, Tissot JD, Wiersum-Osselton J. Working Party on Haemovigilance: Proposed standard definitions for surveillance of non infectious adverse transfusion reactions. Available at: <http://www.ihn-org.com/wp-content/uploads/2011/06/ISBT-definitions-for-non-infectious-transfusion-reactions>.
124. Raval JS, Mazepa MA, Russell SL, Immel CC, Whinna HC, Park YA. Passive reporting greatly underestimates the rate of transfusion-associated circulatory overload after platelet transfusion *Vox Sang*. 2015; 108:387–392.

125. Roubinian NH, Looney MR, Kor DJ, Lowell CA, Gajic O, Hubmayr RD, et al. Cytokines and clinical predictors in distinguishing pulmonary transfusion reactions. *Transfusion*. 2015; 55(8):1838-1846.
126. Maslanka K, Uhrynowska M, Łopacz P, Wrobel A., Smolenska-Sym G., Guz K, et al. Analysis of leucocyte antibodies, cytokines, lysophospholipids and cell microparticles in blood components implicated in post-transfusion reactions with dyspnoea. *Vox Sang*. 2015; 108:27–36.
127. Badami KG, Joliffe E, Stephens M. Transfusion-associated dyspnoea – shadow or substance? *Vox Sang* 2015; 109:197–200.
128. Nishimura M, Uchida S, Mitsunaga S, Yahagi Y, Nakajima K, Tadokoro K, et al. Characterization of T-Cell Clones Derived From Peripheral Blood Lymphocytes of a Patient With Transfusion-Associated Graft-Versus-Host Disease: Fas-Mediated Killing by CD4⁺ and CD8⁺ Cytotoxic T-Cell Clones and Tumor Necrosis Factor β Production by CD4⁺ T-Cell Clones. 1997; *Blood*: 89 (4):1440-1445.
129. Murphy MF. Post -Transfusion purpura In *Practical Transfusion Medicine*. Fourth edition Murphy MF, Pamphilon DH, Heddle NM. Editors, Wiley-Blackwell, Oxford, 2013. p127-131.
130. Roubinian NH, Leavitt AD. Shedding a little light on posttransfusion purpura. *Transfusion*. 2015; 55(2):232-234.
131. Delicou S, Bellia M. Alloimmune thrombocytopaenic disorders a review. *EMJ Oncol*. 2015; 3[1]:59-64

132. Du Pont-Thibodeau G, Robitaille N, Gauvin F, Thibault L, Rivard GE, Lacroix J, et al. Incidence of hypotension and acute hypotensive transfusion reactions following platelet concentrate transfusions. *Vox Sang.* 2016; 110:150–158.
133. Savage W. The unique challenges of hemovigilance for pediatric patients. *Transfusion.* 2015; 55:466–467.
134. Zumberg MS, del Rosario MLU, Nejame CF, Pollock BH, Garzarella L, Kao KJ et al. A Prospective Randomized Trial of Prophylactic Platelet Transfusion and Bleeding Incidence in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: 10,000/ μ L versus 20,000/ μ L Trigger. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8:569-576
135. Diedrich B, Remberger M, Shanwell A, Svahn BM, Ringdén O. A prospective randomized trial of a prophylactic platelet transfusion trigger of 10×10^9 per L versus 30×10^9 per L in allogeneic hematopoietic progenitor cell transplant recipients. *Transfusion* 2005; 45:1064-1072.
136. Pavenski K, Freedman J, Semple JW. HLA alloimmunization against platelet transfusions: pathophysiology, significance, prevention and management. *Tissue Antigens* 2012; 79:237–245.
137. Ferreira AA, Zulli R, Soares S, Castro V, Moraes-Souza H. Identification of platelet refractoriness in oncohematologic patients. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66(1):35-40.
138. Luban NLC, McBride E, Ford CJ, Gupta S. Transfusion Medicine Problems and Solutions for the Pediatric Hematologist/Oncologist. *Pediatric Blood Cancer* 2012; 58:1106–1111.
139. Dijkstra-Tiekstra MJ, Rondeel JMM, Slomp J, Smid WM, de Wildt-Eggen J. A positive effect of immune suppression on corrected

count increment after platelet transfusion at 1 but not at 24 h. *Transfus Apher Sci* 2013; 49:189–192.

140. Wiita AP, Nambiar A. Longitudinal management with crossmatch-compatible platelets for refractory patients: alloimmunization, response to transfusion, and clinical outcomes. *Transfusion*. 2012; 52(10):2146–2154.
141. Li G, Liu F, Mao X, Hu L. The investigation of platelet transfusion refractory in 69 malignant patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci*. 2011; 45(1):21-4.
142. Slichter SJ, Davis K, Enright H, et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood* 2005; 105(10):4106-14.
143. Luzzatto G, Cella G, Messina C, et al. Markers of Endothelial Function in Pediatric Stem Cell Transplantation for Acute Leukemia. *Med Pediatr Oncol* 2003; 40(1):9–12.
144. Woywodt A, Haubitz M, Buchholz S, et al. Counting the cost: markers of endothelial damage in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2004; 34(12):1015–23.
145. de Vos FYFL, Willemse PHB, de Vries EGE, Gietema JA. Endothelial cell effects of cytotoxics: balance between desired and unwanted effects. *Cancer Treatment Rev*. 2004; 30: 495–513.
146. Salat C, Holler E, Kolb HJ, Pihusch R, Reinhardt B, Hiller E. Endothelial cell markers in bone marrow transplant recipients with and

- without acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 1997; 19: 909–914.
147. Larsen AM, Leinøe EB, Johansson PI, Larsen R, Wantzin P, Birgens H. et al. Haemostatic function and biomarkers of endothelial damage before and after platelet transfusion in patients with acute myeloid leukaemia. *Transfusion Med*. 2015 25 (3):174-83.
148. Larsen AM, Leinøe EB, Johansson PI, Birgens H, Ostrowski SR. Haemostatic function and biomarkers of endothelial damage before and after RBC transfusion in patients with haematologic disease. *Vox Sang*. 2015; 109(1):52-61.
149. Fasano RM, Mamcarz E, Adams S, Donohue Jerussi T, Sugimoto K, Tian X, et al. Persistence of recipient human leucocyte antigen (HLA) antibodies and production of donor HLA antibodies following reduced intensity allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2014; 166(3):425-434
150. Nash RA, Gooley T, Davis C, Appelbaum FR. The Problem of Thrombocytopenia after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *The Oncologist*. 1996; 1:371-380.
151. Lapierre V, Auperin A, Tayebi H, Chabod J, Saas P, Michalet M et al. Increased presence of anti-HLA antibodies early after allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation compared with bone marrow transplantation. *Blood*. 2002; 100:1484–1489.
152. Toor AA, Choo SY, Little JA. Bleeding risk and platelet transfusion refractoriness in patients with acute myelogenous leukemia who undergo autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000; 26(3):315–320.

153. Jia Y, Li W, Liu N, Zhang K, Gong Z, Li D, et al. Prevalence of platelet-specific antibodies and efficacy of crossmatch-compatible platelet transfusions in refractory patients. *Transfus Med.* 2014; 24, 406-410.
154. Brouk H, Bertrand G, Zitouni S, Djenouni A, Martageix C, Griffi F et al. HPA antibodies in Algerian multitransfused patients: Prevalence and involvement in platelet refractoriness. *Transfus Apher Sci.* 2015; 52(3):295-299.
155. Hogge DE, McConnell M, Jacobson C, Sutherland HJ, Benny WB, Massing BG. Platelet refractoriness and alloimmunization in pediatric oncology and bone marrow transplant patients. *Transfusion.* 1995; 35(8):645-52.
156. Ciurea SO, Thall PF, Milton DR, Barnes TH, Kongtim P, Carmazzi Y et al. Complement-Binding Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Risk of Primary Graft Failure in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015; (21): 1392-1398.
157. Nakazawa Y, Saito S, Hasegawa Y, Yanagisawa R, Sakashita K, Kamijo T et al. Fatal platelet transfusion refractoriness after peripheral blood possible role for the production of multiple HLA antibodies in progenitor cell transplantation from the mother in a patient with relapsed leukemia. *Transfusion.* 2007; 47:326-334.
158. Rebibo D, Hauser L, Slimani A, Hervé P, Andreu G. The French Haemovigilance System: organization and results for 2003. *Transfus Apher Sci* 2004; 31:145-153.

159. Moncharmont P, Rigal D. Prevalence of platelet-specific antibodies in the recipients of platelet units with transfusion adverse event. *Transfus Clin Biolog.* 2012; 19: 333-337.
160. Tazzari P, Bontadini A, Zamagni C, Ricci F, Fruet F, Iannelli S. et al. Febrile nonhaemolytic transfusion reaction caused by antibodies against human platelet antigen 5a. *Transfus Med.* 2005; 15: 443-444.
161. Dettke M, Dreer M, Höcker P, Panzer S. Human platelet antigen-1a antibodies induce the release of the chemokine RANTES from human platelets. *Vox Sang* 2001; 81:199–203.
162. Triulzi J. D, Assmann F. S, Strauss G. R, Ness P. M, Hess R. J, Kaufman M. R, Granger S, Slichter J. S. The impact of platelet transfusion characteristics on posttransfusion platelet increments and clinical bleeding in patients with hypoproliferative thrombocytopenia. *Blood.* 2012; 119:23.
163. Nahirniak S, Slichter SJ, Tanael S, Rebullia P, Pavenski K, Vassallo R et al. Guidance on Platelet Transfusion for Patients With Hypoproliferative Thrombocytopenia *Transfus Med Rev.* 2015; 29:3–13.
164. Jackman RP, Deng X, Bolgiano D, Lebedeva M, Heitman JW, Busch MP et al. Low-level HLA antibodies do not predict platelet transfusion failure in TRAP study participants. *Blood.* 2013; 121(16):3261–3266.
165. Stanworth J. S, Navarrete C, Estcourt L, Marsh J. Platelet refractoriness – practical approaches and ongoing dilemmas in patient management. *Br J Haematol.* 2015; 171(3):297–305.
166. Hume HA, Preiksaitis JB. Transfusion associated graft-versus-host disease, cytomegalovirus infection and HLA alloimmunization in neonatal and pediatric patients. *Transfus Sci.* 1999; 21(1):73-95.

167. Li N, Williams L, Zhou Z, Wu YY. Incidence of acute transfusion reactions to platelets in hospitalized pediatric patients based on the USA hemovigilance reporting system. *Transfusion*. 2014; 54: 1666-72.
168. Veljković D, Janković B, Pašić S, Bogdanović G, Vavić N, Šerbić O, Mijomanović B, Vasiljević Z. Neposredne transfuzijske reakcije kod pedijatrijskih bolesnika. *Bilten za transfuziologiju* 2007; 53(1-2): 29-34.
169. Veljković D, Šerbić O, Kuzmanović M, Pašić S. Imunološki aspekti transfuzije i transfuzijske reakcije. *Problemi u pedijatriji* 2005; 26: 372-382.
170. Kaufman RM, Assmann SF, Triulzi DJ, Strauss RG, Ness P, Granger S, Slichter SJ. Transfusion-related adverse events in the Platelet Dose study. *Transfusion*. 2015; 55(1): 144-53.
171. Couban S, Carruthers J, Andreou P, Klama LN, Barr R, Kelton JG. Platelet transfusions in children: results of a randomized, prospective, crossover trial of plasma removal and a prospective audit of WBC reduction. *Transfusion*. 2002; 42(6):753-8.
172. Yanagisawa R, Shimodaira S, Sakashita K, Hidaka Y, Kojima S, Nishijima F, Hidaka E, Shiohara M, Nakamura T. Factors related to allergic transfusion reactions and febrile non-haemolytic transfusion reactions in children. *Vox Sang*. 2016; 110(4):376-84.
173. Seghatchian MJ, Wadhwat M, Thorpet R. Cytokines in Platelet Concentrates: A Comparison of pheresis Platelet (Haemonetics) and Filtered and Unfiltered Pooled Buffy-coat Derived Platelet Concentrates. *Transfus Sci*. 1997; 1:103-7.
174. Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor

outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest*. 1995 ;107(4):1062-73.

175. Costa EJ, Guimarães TMPD, de Almeida NC, de Toledo V de PCP. Comparison of cytokine levels and metabolic parameters of stored platelet concentrates of the Fundação Hemominas, Belo Horizonte, Brazil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2012; 34(2): 94-9.
176. Muylle L, Joos M, Wouters E, De Bock R, Peetermans ME. Increased tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF alpha and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion*. 1993; 33(3): 195-9.
177. Muylle L, Wouters E, Peetermans ME. Febrile reactions to platelet transfusion: the effect of increased interleukin 6 levels in concentrates prepared by the platelet-rich plasma method. *Transfusion*. 1996; 36(10): 886-90.
178. Heddle NM, Klama L, Meyer R, Walker I, Boshkov L, Roberts R, Chambers S, Podlosky L, O'Hoski P, Levine M. A randomized controlled trial comparing plasma removal with white cell reduction to prevent reactions to platelets. *Transfusion*. 1999; 39(3): 231-8.
179. Schefold JC, Hasper D, von Haehling S, Meisel C, Reinke P, Schlosser HG. Interleukin-6 serum level assessment using a new qualitative point-of-care test in sepsis: A comparison with ELISA measurements. *Clin Biochem*. 2008; 41(10-11): 893-8.
180. Shaiegan M, Pourfatollah AA, Namiri M, Babae G. Generation of IL-8 and TNF-alpha in platelet concentrates during storage. *Arch Iran Med*. 2006; 9(1): 61-4.

181. Savage WJ, Tobian AAR, Savage JH, Hamilton RG, Borge PD, Kaufman RM. Transfusion and component characteristics are not associated with allergic transfusion reactions to apheresis platelets. *Transfusion*. 2015; 55: 296-300.
182. Shanwel A, Falker C, Gulliksson H. Storage of platelets in additive solutions: The effects of magnesium and potassium on the release of RANTES, β -thromboglobulin, platelet factor 4 and interleukin-7, during storage. *Vox Sang*. 2003; 85(3): 206-12.
183. van Rhenen DJ. Clinical use of platelet additive solutions. *Transfus Apher Sci* 2007; 37(3):269–72.
184. van Rhenen DJ, Gulliksson H, Cazenave JP, et al. Therapeutic efficacy of pooled buffy-coat platelet components prepared and stored with a platelet additive solution. *Transfus Med* 2004; 14(4):289–95.
185. Larrea L, Carpio N, Arbona C, et al. Clinical Evaluation of Platelet Concentrates Either in Plasma or in Additive Solution. *The Open Hematol J* 2008; 2(1):25-9.
186. van der Meer PF, Kerkhoffs LJ, Curvers J, et al. In vitro comparison of platelet storage in plasma and in four platelet additive solutions, and the effect of pathogen reduction: a proposal for an in vitro rating system. *Vox Sang* 2010; 98(4):517-24.
187. Diedrich B, Ringdén O, Watz E, et al. A randomized study of buffy coat platelets in platelet additive solution stored 1–5 versus 6–7 days prior to prophylactic transfusion of allogeneic haematopoietic progenitor cell transplant recipients. *Vox Sang* 2009; 97(3):254–9.

SPISAK SKRAĆENICA

- TPO** trombopoetin
HPA humani trombocitni antigeni (Human Platelet Antigens)
GP glikoprotein
- MHC** molekuli glavnog histokompatibilnog kompleksa
HLA humani leukocitni antigeni
- CTL** citotoksični T limfociti
OKS otvoreni kanalikularni sistem
TFPI inhibitor tkivnog puta
vWF von Willebrandov faktor
ADP adenzin difosfat
TLRs Toll like receptori
IL 1 β interleukin 1 beta
TGF β transformirajući faktor rasta beta
LPS lipopolisaharidi
NK ćelije ćelije prirodne ubice
TSP I trombospondin 1
VEGF vaskularni endotelni faktor rasta
PDGF trombocitni faktor rasta
PF trombocitni faktor
TREM1 ligand aktivirajućeg receptor na mijeloidnim ćelijama (*triggering receptor expressed on myeloid cells*)
IL interleukin
PNA d adresin perifernog čvora
PSGL-1 P selektin glikoprotein liganda – 1
TRALI transfuzijom povezano akutno oštećenje pluća
ITP imuna trombocitopenija
FNAIT fetalna / neonatalna aloimuna trombocitopenija
HIV humani virus imunodeficijencije
HCV hepatitis C virus
ATP adenzin trifosfat

DIK diseminovana intravaskularna koagulacija
MDS mijelodisplazni sindrom
BMT transplantacija matičnih ćelija (Bone Marrow Transplantation)
GVHD Bolest kalem protiv domaćina (Graft Versus Host Disease)
DDAVP d-amino d-arginin vasopresin
IVIG intravenski imunoglobulini
TTP trombozna trombocitopenijska purpura
HIT heparinom indukovana trombocitopenija
PTP posttransfuziona purpura
PRP plazma bogata trombocitima
BC trombocitno-leukocitni sloj (Buffy Coat)
PAS aditivni rastvor za trombocite (Platelet Aditive Solution)
CMV citomegalo virus
βTG beta transformirajući faktor rasta
LDH laktat dehidrogenaza
KBT korigovani broj trombocita
ADAPT aloimunizacija nakon D inkompatibilnih transfuzija trombocita
FNHTR febrilna nehemolizna transfuzijska reakcija
TACO s transfuzijom povezano opterećenje cirkulacije
HTR hemolizna transfuzijska reakcija
DCT direktan Coombsov test
BMR modifer biološkog odgovora
PRT postupak redukcije patogena
ATR alergijska transfuzijska reakcija
PAF faktor stimulacije trombocita
CFU jedinica formiranja kolonija
TTISS Transfusion Transmitted Injuries Surveillance System
ZSP zamrznuta sveža plazma
Anti-HNA specifična humana neutrofilna aloantitela
GAT granulocitni aglutinacioni test
PC protočna citometrija

MAIGA imobilizacija granulocitnih antigena monoklonskim antitelima

TAD transfuzijom povezana dispnea

RANTES Regulator aktivacije, ekspresovan i sekretovan od normalnih T ćelija

BIOGRAFIJA

Dr Olivera Šerbić Nonković rođena je 22. Jula 1966. godine u Vukovaru gde je završila osnovnu i srednju školu. Na Medicinskom fakultetu Univerziteta Novi Sad diplomirala je 19.6.1990. sa prosečnom ocenom 9.12. Posle obavljenog obaveznog lekarskog staža i položenog državnog ispita u Beogradu 1991. zaposlila se u Zdravstvenom Centru "Sveti Sava" u Vukovaru.

Specijalistički ispit iz Transfuziologije položila je sa odličnim uspehom 26. Juna 1997. Magistarsku tezu pod naslovom "Ispitivanje funkcije trombocita u antifosfolipidnom sindromu" odbranila je 12. Juna 2001. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, mentor Prof. dr Ivo Elezović. Zvanje primarijusa dobila 2008. godine.

Kao lekar specijalista transfuziologije radila je u Službi za transfuziju krvi, ZC »Južni Banat« Pančevo i Službi za transfuziju krvi KBC Zvezdara Beograd. Od oktobra 2003. do danas radi u Službi za transfuziju krvi Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić", od 2014. godine kao načelnik Odeljenja za transfuziju krvi.

Kao nosilac stipendije Svetske federacije za hemofiliju za 2013. godinu provela je mesec dana na studijskom boravku u Katharine Dormandy Haemophilia Centre and Thrombosis Unit, Royal Free Hospital, London, UK. Član je SLD Sekcije za transfuziologiju, Sekcije za hematologiju, Subsekcije za pedijatrijsku hematoonkologiju, Udruženja za hemostazu i trombozu Srbije. Autor i koautor je više od 30 stručnih radova objavljenih u celosti u referentnim stranim i domaćim časopisima i 9 poglavlja u knjigama. Učestvovala je na brojnim domaćim i međunarodnim stručnim skupovima sa preko 70 radova objavljenih u izvodima u zborniku radova.

Veće naučnih oblasti medicinskih nauka na sednici održanoj 05. jula 2011. godine odobrilo je izradu doktorske disertacije dr Oliveri Šerbić Nonković sa temom: "Efektivnost i podnošljivost transfuzija trombocita kod bolesnika uzrasta od jednog meseca do 18 godina", a za mentora je određena Prof.dr Dragana Vujić i za komentora N. Sar. dr Dobrila Veljković.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Olivera Šerbić Nonković

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Ispitivanje efektivnosti i podnošljivosti transfuzija trombocita kod bolesnika
uzrasta od jednog meseca do 18 godina“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, __05.8.2016._____

Olivera Šerbić Nonković

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Ime i prezime autora Olivera Šerbić Nonković

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada **„Ispitivanje efektivnosti i podnošljivosti transfuzija trombocita kod bolesnika uzrasta od jednog meseca do 18 godina”**

Mentor Prof. dr Dragana Vujić

Potpisani Olivera Šerbić Nonković

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 05.8.2016.

Olivera Šerbić Nonković

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Ispitivanje efektivnosti i podnošljivosti transfuzija trombocita kod bolesnika uzrasta od jednog meseca do 18 godina“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, __05.8.2016._____

Oliver Jorhi Vanković

