

# Uloga protutrombocitnih protutijela u dijagnostičkoj obradi trombocitopenije

---

Romić, Marcela

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:668187>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marcela Romić**

**Uloga protutrombocitnih protutijela u  
dijagnostičkoj obradi trombocitopenije**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2021.**

Ovaj diplomski rad izrađen je u Kliničkom bolničkom centru Zagreb na Zavodu za hematologiju pod vodstvom doc.dr.sc. Ane Boban i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

# KRATICE

AA – aplastična anemija

ALL – akutna limfocitna leukemija

AML – akutna mijeloična leukemija

CLL – kronična limfocitna leukemija

DIK – diseminirana intravaskularna koagulacija

HBV – virus hepatitisa B

HCV – virus hepatitisa C

HIV – virus humane imunodeficijencije

HUS – hemolitično-uremični sindrom

IgG – imunoglobulin G

IL-3 – interleukin 3

IL-6 – interleukin 6

IL-11 – interleukin 11

ITP – imunotrombocitopenija

RA – reumatoidni artritis

SLE – sistemski eritematozni lupus

TPO – trombopoetin

TTP – Trombotična trombocitopenična purpura

# SADRŽAJ

<b>1. SAŽETAK</b>	
<b>2. SUMMARY</b>	
<b>3. UVOD.....</b>	<b>1</b>
3.1 Trombociti.....	1
3.1.1 Uloga trombocita u primarnoj hemostazi.....	2
3.2 Trombocitopenija.....	2
3.2.1 Definicija trombocitopenije.....	2
3.2.2 Etiologija trombocitopenije.....	3
3.3 Imunotrombocitopenija.....	5
3.3.1 Tipovi imunotrombocitopenije.....	5
3.3.2 Epidemiologija imunotrombocitopenije.....	6
3.3.3 Patofiziologija imunotrombocitopenije.....	6
3.4 Uloga antitrombocitnih protutijela u patofiziologiji ITP-a.....	8
3.5 Dijagnostička obrada trombocitopenije.....	8
3.5.1. Dijagnostika antitrombocitnih protutijela.....	10
3.5.1.1. Metoda imunofluorescencije na protočnom citometru za dokazivanje vezanih antitrombocitnih protutijela.....	10
3.5.1.2. Metoda na mikrosferama.....	10
3.5.1.3. Test imobilizacije trombocitnih antigena pomoću monoklonskih protutijela (MAIPA).....	11
3.6 Terapijski postupak kod imunotrombocitopenije.....	11
3.6.1 Prva linija liječenja.....	11
3.6.2 Druga linija liječenja.....	12
3.6.3 Treća i kasnije linije liječenja.....	12

<b>4. HIPOTEZA.....</b>	<b>14</b>
<b>5. CILJEVI RADA.....</b>	<b>15</b>
<b>6. ISPITANICI I METODE.....</b>	<b>16</b>
<b>7. REZULTATI.....</b>	<b>18</b>
<b>8. RASPRAVA.....</b>	<b>35</b>
<b>9. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>38</b>
<b>10.ZAHVALE.....</b>	<b>39</b>
<b>11.LITERATURA.....</b>	<b>40</b>
<b>12.ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>44</b>

# 1. SAŽETAK

Uloga protutrombocitnih protutijela u dijagnostičkoj obradi trombocitopenija

Marcela Romić, 2021.

Imunotrombocitopenija (ITP) je bolest autoimune etiologije obilježena smanjenim brojem trombocita u perifernoj krvi. Najčešće nastaje uništavanjem trombocita cirkulirajućim antitrombocitnim protutijelima u krvi bolesnika. Bolest pogađa sve dobne skupine, a incidencija raste s dobi. Dijagnoza se postavlja isključivanjem ostalih poznatih sekundarnih uzroka trombocitopenije.

Cilj ovog istraživanja bio je otkriti ulogu antitrombocitnih protutijela u dijagnozi trombocitopenija, odnosno može li se testom specifičnih antitrombocitnih protutijela sa sigurnošću postaviti dijagnoza ITP-a. Provedeno je retrospektivno istraživanje koje je uključilo 116 bolesnika u periodu od 1. siječnja do 31. prosinca 2020. godine koji su bili obrađivani zbog trombocitopenije u Kliničkom bolničkom centru Zagreb.

Bolesnicima je rađen nalaz antitrombocitnih protutijela i zatim je utvrđivana specifičnost nalaza za postavljanje dijagnoze ITP-a. Uspoređene su postavljene dijagnoze uzroka trombocitopenija i rezultati nalaza antitrombocitnih protutijela te je utvrđena specifičnost i osjetljivost testa za postavljanje dijagnoze ITP-a. Test je pokazao osjetljivost od 13,8% i specifičnost od 95,8%. Pozitivan nalaz antitrombocitnih protutijela specifičnih za ITP ima veliku vrijednost u postavljanju dijagnoze, dok negativan nalaz ne isključuje mogućnost imune etiologije bolesti.

**Ključne riječi: trombocitopenija, ITP, antitrombocitna protutijela**

## 2. SUMMARY

The Role of Antiplatelet Antibodies in Diagnostics of Thrombocytopenia

Marcela Romić, 2021.

Immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disorder characterized by abnormally low platelet count in the peripheral blood. It most commonly occurs when circulating antiplatelet antibodies attack and destroy platelets in the patient's blood. ITP can affect all age groups, with the incidence increasing with age. The diagnosis is formally made by eliminating all other known causes of secondary thrombocytopenia.

The purpose of this research was to establish the role of antiplatelet antibodies in the diagnostic algorithm of thrombocytopenia, specifically whether specific antiplatelet antibodies test can be used to make the diagnosis of ITP. A retrospective research including 116 patients observed for thrombocytopenia was conducted in the period from January 1<sup>st</sup> to December 31<sup>st</sup> 2020 in the Clinical Hospital Centre Zagreb. Antiplatelet antibodies test was performed in every patient and the findings were used to determine specificity of the test in the diagnosis of ITP. Established diagnoses of thrombocytopenia and findings from the antiplatelet antibodies test were compared thus leading to sensitivity and specificity of the test in making the diagnosis of ITP. The test showed sensitivity of 13.8% and specificity of 95.8%. Positive antiplatelet antibodies test specific for ITP has a great value in making the diagnosis, and a negative test does not rule out the possibility of immune-mediated aetiology of the disease.

**Key words: thrombocytopenia, ITP, antiplatelet antibodies**



## 3. UVOD

### 3.1. TROMBOCITI

Trombociti su diskoidne stanice bez jezgre čija je glavna uloga regulacija hemostaze, ali sudjeluju i u angiogenezi i prirođenom imunitetu. Nastaju primarno u koštanoj srži procesom trombocitopoeze otkidajući se od najvećih (30-100  $\mu\text{m}$ ) hematopoetskih stanica zvanih megakariociti (1,2). Promjera su 2-3  $\mu\text{m}$  i u cirkulaciji se zadržavaju između 8 i 10 dana (2). Kako bi se u krvi održao broj trombocita od  $150-400 \times 10^9/\text{L}$  dnevno se treba proizvesti oko  $100 \times 10^9$  novih trombocita. Megakariociti čine manje od 0,1% stanica koštane srži, a njihova proizvodnja može biti regulirana trombopoetinom (TPO), kemokinima ili lokaliziranom ekspresijom liganda koji se vežu na receptore na membrani megakariocita (2). TPO je glavni glavni faktor u poticanju proizvodnje trombocita i njegovo povećano otpuštanje je povezano sa stanjem trombocitopenije (3). Osim TPO-a, trombocitopoezu potiču interleukini IL-3, IL-6 te IL-11 (2). Prilikom sazrijevanja megakariocita njihova membrana se povećava i stvara invaginacije te pruža izdanke u sinusoidne krvne žile (2,3). Odvajanjem tih dijelova membrane nastaju preteče trombocita.

Na membrani trombocita su gusto posloženi razni receptori koji reguliraju aktivaciju trombocita i omogućavanje hemostaze. Čak 20% membrane je prekriveno receptorima među kojima se se ističu receptor za trombin, IgG (Fc $\gamma$ RIIA) te glikoproteini GP $\alpha$ IIb $\beta$ 3 i GPIb/IX/V (3). Receptori im omogućuju vezanje za oštećenu krvnu žilu pomoću von Willebrandovog faktora i direktno na kolagen te sprječavanje daljnjeg krvarenja. Tijekom tog procesa mijenjaju svoj oblik, ispuštaju granule iz

citoplazme i aktiviraju fibrinogen te druge trombocite s kojima se zatim sljepljuju i uspješnije ograničavaju krvarenje (4).

### **3.1.1. Uloga trombocita u primarnoj hemostazi**

Primarna hemostaza je fiziološki proces koji zaustavlja prekomjerno krvarenje nakon ozljede krvne žile. Postojanje trombocita je osnovna komponenta jer reakcije hemostaze obuhvaćaju adheziju trombocita na rubove ozlijeđene krvne žile, njihovo širenje na otkriveni subendotel i sekreciju vazoaktivnih tvari te stvaranje trombocitnih agregata. Na oštećeni endotel lijepe se preko trombocitnih glikoproteina IIb/IIIa vezanjem s Von Willebrandovim faktorom, fibrinogenom, fibronektinom i vitronektinom. Aktivacijom trombocita oni izbacuju vazoaktivne tvari iz trombocitnih granula i otkrivaju različite receptore na svojoj površini (5).

Također, vrlo je važna uloga trombocita u sekundarnoj hemostazi. Naime, aktivacija koaguacijskih faktora koji vode stvaranju fibrinskog ugruška događa se na membrani aktiviranih trombocita (6). Receptori trombocitne membrane vežu specifične faktore zgrušavanja poput faktora Va koji veže faktor Xa i dovodi do aktivacije protrombina u trombin. Trombin zatim aktivira fibrinogen i dovodi do stvaranja fibrinskih niti bitnih za stvaranje ugruška (5).

## **3.2 TROMBOCITOPENIJA**

### **3.2.1. Definicija trombocitopenije**

Trombocitopenija je stanje definirano brojem trombocita u perifernoj krvi manjim od  $150 \times 10^9/L$ . Najčešće se otkrije slučajno nalazom kompletne krvne slike.

Trombocitopenija se pojavljuje izolirano kao jedini hematološki poremećaj, a može

biti i posljedica drugih patoloških stanja poput akutnih infekcija, heparinom izazvane trombocitopenije, trombotične trombocitopenične purpure, hemolitičko-uremičnog sindroma ili u sklopu drugih hematoloških poremećaja (7). Simptomi se obično ne pojavljuju prije nego što broj trombocita padne ispod  $20 \times 10^9/L$ . U slučajevima broja trombocita između  $30$  i  $50 \times 10^9/L$  može doći do većih krvarenja pri traumatskim ozljedama. Pri broju trombocita od  $10$  do  $30 \times 10^9/L$  dolazi do krvarenja i pri minimalnim traumama, a ako broj trombocita padne ispod  $10 \times 10^9/L$  povećan je rizik od spontanih krvarenja, petehija i hematoma (8). Spontana mukokutana krvarenja, gastrointestinalna, genitourinarna i intracerebralna krvarenja koja mogu dovesti do smrti najčešća su kod pada broja trombocita ispod  $5 \times 10^9/L$  i hitna su stanja (9).

### **3.2.2 Etiologija trombocitopenije**

Razni su uzroci trombocitopenija, a načelno se dijele u tri velike skupine.

Trombocitopenija može biti uzrokovana smanjenim stvaranjem trombocita, njihovom povećanom razgradnjom ili sekvestracijom trombocita u slezeni.

Smanjeno stvaranje trombocita može biti posljedica zatajenja koštane srži u slučaju aplastične anemije, primarnih tumora koštane srži, metastatskih tumora sa zahvaćanjem koštane srži, nedostatka vitamina te djelovanja raznih lijekova i toksina, zračenja te alkohola. Od lijekova koji dovode do trombocitopenije ističu se citostatici, estrogeni, tiazidi, benzen i kloramfenikol (8). Takve trombocitopenije se nazivaju amegakariocitne jer ih uzrokuje nedostatak prekursora trombocita u koštanoj srži, megakariocita. Najčešće se javljaju u sklopu promjena i ostalih loza hematopoeze, iako se mogu javiti i izolirano.

Prevelika sekvestracija trombocita u slezeni događa se u slučajevima povećane

slezene koji su prisutni kod ciroze jetre i kroničnih bolesti jetre. Stanje povećane slezene koje dovodi do povećanog razaranja trombocita se naziva hipersplenizam. Do povećanog razaranja može doći prilikom hemolitičko- uremijskog sindroma (HUS-a), imunosne trombocitopenije (ITP-a), diseminirane intravaskularne koagulacije (DIK-a), virusnih infekcija, tijekom autoimunih bolesti, zbog trombotske trombocitopenične purpura (TTP-a) te nakon uzimanja određenih lijekova. Lijekovi koji mogu dovesti do povećane razgradnje su razni antibiotici (penicilin, cefalosporini, sulfonamidi), antihipertenzivi, diuretici (furosemid, metildopa), acetilsalicilna kiselina, heparin, kardiovaskularni lijekovi (kinin, digoksin) i antidijabetici (tolbutamid, klorpropramid) (8).

Izolirana trombocitopenija se najčešće pojavljuje kao znak imunotrombocitopenije (9).

Tablica 1. Etiološka podjela uzroka trombocitopenije

<b>Smanjeno stvaranje trombocita</b>	<b>Povećana razgradnja trombocita</b>	<b>Sekvestracija trombocita u slezeni</b>
aplastična anemija	HUS	ciroza jetre
tumorska infiltracija	ITP	kronični HBV / HCV
oštećenje zračenjem	DIK	leukemije
utjecaj alkohola	virusna infekcija	limfomi
oštećenje lijekovima	autoimune bolesti	
nedostatak vitamina B12	TTP	
nedostatak folne kiseline		

HUS, hemolitičko-uremijski sindrom; ITP, imunosna trombocitopenija; DIK, diseminirana intravaskularna koagulacija; TTP, trombotična trombocitopenična purpura; HBV, virus hepatitisa B; HCV, virus hepatitisa C

### **3.3 IMUNOTROMBOCITOPENIJA**

Imunotrombocitopenija (ITP) stečeni je hematološki poremećaj koji pogađa bolesnike svih dobnih i etničkih skupina (10). Primarna imunotrombocitopenija je karakterizirana izoliranom trombocitopenijom bez drugih bolesti i uzroka koji bi do nje mogli dovesti, a sekundarna obuhvaća sve oblike imunotrombocitopenija povezane s drugim bolestima koje su do nje dovele (7). Primarna ITP se definira kao stečeni autoimunski poremećaj koji dovodi do izoliranog smanjenja broja trombocita ispod  $100 \times 10^9/L$  u perifernoj krvi, uz izostanak uzročnog ili osnovnog stanja koje je moglo dovesti do trombocitopenije (14). Manjak trombocita najčešće nastaje njihovim razaranjem uzorokovanim antitrombocitnim i antimegakariocitnim protutijelima u krvi.

#### **3.3.1 TIPOVI IMUNOTROMBOCITOPENIJE**

Imunotrombocitopenija ne traje jednako dugo kod svih bolesnika te može biti asimptomatska. Prema trajanju bolesti dijeli se na novodijagnosticiranu ITP, koja je dijagnosticirana unutar 3 mjeseca, perzistentnu, koja traje 3-12 mjeseci te kroničnu koja traje dulje od 12 mjeseci (10).

Teški oblik ITP-a obuhvaća oblike bolesti kod kojih bolesnik pri dijagnozi ima simptome krvarenja ili razvije simptome u tijeku trajanja terapije.

Refrakterni ITP označava slučajeve u kojima se liječenjem ne postiže odgovor na terapiju ili je došlo do novog pogoršanja te bolesnik ima rizik od novog krvarenja i treba daljnju terapiju (10).

### **3.3.2 EPIDEMIOLOGIJA IMUNOTROMBOCITOPENIJE**

ITP zahvaća sve dobne skupine, a u odraslih ima prevalenciju od 9,5/100.000 koja se povećava s dobi (11,12). U usporedbi s muškarcima, kod žena se javlja u mlađoj dobi no ukupno nema razlike u prevalenciji između spolova. U odraslih se najčešće prezentira kroničnim tijekom (>1 godine u 80 % oboljelih), dok je kod djece bolest češće akutna tijeka (13). ITP je povezan s većim rizikom od tromboembolije, većim rizikom od smrti kod težih oblika bolesti te povećanim rizikom od krvarenja i infekcije (11).

### **3.3.3. PATOFIZIOLOGIJA IMUNOTROMBOCITOPENIJE**

Trombocitopenija kao glavno obilježje ITP-a nastaje različitim imunskim mehanizmima koji dovode do uništavanja trombocita u slezeni i/ili neprikladnom proizvodnjom trombocita u koštanoj srži. Stanice imunološkog sustava koje imaju glavnu ulogu u autoimunoj reakciji ove bolesti su pomoćnički T limfociti, makrofagi, limfociti B i citotoksični limfociti T. Limfociti B potaknuti pomoćničkim limfocitima T u slezeni proizvode antitrombocitna protutijela koja se većinom vežu na glikoproteine ili njihove komplekse. Uništavanje trombocita događa se ih kad autoprotutijela prepoznaju i pokreću fagocitozu posredovanu makrofazima te apoptozu posredovanu citotoksičnim T-limfocitima. Osim perifernog uništavanja trombocita, važnu ulogu u patofiziologiji bolesti ima i smanjena proizvodnja trombocita u koštanoj srži zbog autoimunog odgovora na megakariocite, stanice od kojih nastaju trombociti, te zbog smanjene razine TPO, ključnog faktora rasta megakariocita (13).

U oko 80% odraslih s ITP-om se radi o primarnom obliku bolesti. Protutijela su prisutna u 60% do 70% bolesnika i nastaju zbog gubitka tolerancije na glikoproteine izražene na membranama trombocita i megakariocita (9-11).

Sekundarna imunotrombocitopenija je autoimuna bolest koja se javlja u skopu drugih bolesti, najčešće infekcija, autoimunih i hematoloških malignih bolesti. Infekcije koje se najčešće povezuju s autoimunom trombocitopenijom su virus imune deficijencije (HIV), virus hepatitisa B i C (HBV, HCV), Epstein Barr virus (EBV), citomegalovirus (CMV), Helicobacter pylori, dok su od autoimunih bolesti najčešći sistemski eritematozni lupus, Sjogrenov i antifosfolipidni sindrom, te obična varijabilna imunodeficijencija (7, 11). Od hematoloških malignih bolesti autoimuna trombocitopenija se najčešće javlja kod bolesnika s non-Hodgkinovim limfomom i kroničnom limfocitnom leukemijom.

Tablica 2. Sekundarni uzroci imunotrombocitopenije

<b>autoimune bolesti</b>	<b>limfoproliferativne</b>	<b>infekcije</b>
SLE	CLL	HIV
RA	Hodgkinov limfom	Helicobacter pylori
antifosfolipidni sindrom	non-Hodgkinov limfom	Cytomegalovirus
Evansov sindrom		Varicella-zoster virus
Autoimuni limfoproliferativni sindrom		HCV

SLE- sistemski eritematozni lupus; RA- reumatoidni artritis; CLL- kronična limfocitna leukemija; HIV- virus humane imunodeficijencije; HCV- virus hepatitisa C

### **3.4 ULOGA ANTITROMBOCITNIH PROTUTIJELA U PATOFIZIOLOGIJI ITP-a**

Glavni patofiziološki mehanizam ITP-a je uništavanje trombocita posredovano IgG antitrombocitnim protutijelima. Protutijela su najčešće usmjerena na glikoproteine  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (GPIIb-IIIa) i GPIb-IX-V koji se nalaze na površini trombocita, a njihovo vezanje na trombocite aktivira fagocite ili razgradnju trombocita pomoću komplementa (14,15). Fagocitoza može biti aktivirana Fc fragmentom IgG protutijela vezanog na trombocite sa i bez vezanja sa C3 komponentom komplementa na trombocite (15). To dovodi do povećanog razaranja trombocita poglavito u slezeni. Protutijela se mogu vezati i direktno na megakariocite i time spriječiti njihovo dozrijevanje i stvaranje novih trombocita.

### **3.5 DIJAGNOSTIČKA OBRADA TROMBOCITOPENIJE**

Dijagnozu ITP-a je moguće postaviti kada se isključe svi drugi poznati česti uzroci sekundarne trombocitopenije. Dijagnostička obrada podrazumijeva dobro uzetu anamnezu i obavljen fizikalni pregled nakon čega slijede provjera kompletne krvne slike i citološka analiza razmaza periferne krvi. Fizikalni pregled uključuje i provjeru znakova krvarenja te hepatosplenomegalije, limfadenopatije i znakove kongenitalnih poremećaja (16). Prvi korak u dijagnozi manjka trombocita je provjera valjanosti nalaza. To podrazumijeva isključivanje pseudotrombocitopenije nastale zbog sljepljivanja trombocita. Pod utjecajem etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) koja se nalazi u epruveti za uzorak krvi moguće je sljepljivanje koje onemogućava brojaču prepoznavanje trombocita i dovodi do lažnog nalaza trombocitopenije.

Pseudotrombocitopenija se isključuje pregledom razmaza periferne krvi koji nam



ujedno pruža uvid u morfologiju trombocita (17). Osim samih trombocita, u razmazu je potrebno pregledati i eritrocite i leukocite jer i poremećaj u tim stanicama može dovesti do trombocitopenije (18).

Budući da se kod bolesnika s ITP-om često javlja i autoimuna hemolitička anemija, tijekom dijagnostičke obrade je potrebno je provjeriti laboratorijske znakove hemolize, učiniti broj retikulocita, bilirubin, LDH i haptoglobin, te napraviti direktni antiglobulinski test. Kako bismo isključili imunotrombocitopeniju koja je posljedica autoimunih bolesti, učinit ćemo imunološke testove probira.

Najčešće infekcije koje mogu dovesti do imune trombocitopenije su hepatitis B, hepatitis C, HIV, te infekcija *Helicobacter pylori*. Stoga kod svakog bolesnika tražimo kliničke značajke ovih infekcija, te radimo serološka testiranja. (16).

Širina obrade kod bolesnika s trombocitopenijom ovisi o ostalim simptomima i znakovima kojima se bolesnik prezentira. Obradom dakle isključujemo stanja koja mogu dovesti do trombocitopenije.

U bolesnika sa sustavnim simptomima i onih kod kojih postoji sumnja na malignu bolest te starijih od 60 preporučeno je napraviti analizu koštane srži. Isto je preporučeno kod bolesnika koji ne odgovaraju na terapiju za ITP ili kod kojih je došlo do relapsa bolesti te prije planirane splenektomije (16).

Kada se potvrdi postojanje trombocitopenije i isključi mogućnost druge etiologije, postavlja se dijagnoza ITP-a.

U evaluaciji trombocitopenije važna je i procjena krvarenja.

### **3.5.1. Dijagnostika antitrombocitnih protutijela**

Test otkrivanja antitrombocitnih protutijela dokazuje vezana i slobodna protutijela.

Provodi se metodom protočne citometrije pri čemu se trombociti bolesnika i zdravih davatelja krvne grupe O testiraju sa serumom bolesnika (19). U slučaju pozitivnog rezultata se obavlja identifikacija protutijela.

Dvije su glavne tehnike koje se koriste u identifikaciji antitrombocitnih protutijela (20).

Protočna citometrija uključuje monoklonska anti-IgG protutijela usmjerena na antitrombocitna protutijela u serumu bolesnika. Koriste se različita monoklonska protutijela koja se specifično vežu na različita autoantitijela u serumu. Time se određuje i na koji su antigen na trombocitu usmjerena protutijela bolesnika (21).

#### **3.5.1.1. Metoda imunofluorescencije na protočnom citometru za dokazivanje vezanih antitrombocitnih protutijela**

Metodom imunofluorescencije na protočnom citometru (PIFT, eng. Platelet immunofluorescence test) otkrivaju se vezana antitrombocitna autoprotutijela razreda IgG i IgM (direktna imunofluorescencija). Rezultat se izražava kao pozitivan ili negativan. Pozitivan rezultat antitrombocitnih protutijela je onaj koji je za 3 standardne devijacije veći od negativne kontrole testa, a govori u prilog vezanih IgM i/ili IgG antitrombocitnih autoprotutijela.

#### **3.5.1.2. Metoda na mikrosferama**

Metoda na mikrosferama (Xmap, eng. Multi-analyze profiling beads) na fluoroanalizatoru Luminex se koristi za dokazivanje slobodnih antitrombocitnih autoprotutijela IgG razreda. Rezultat se izražava kao pozitivan ili negativan te daje

informaciju o kojim se autoprotutijelima radi (protutijela na GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa i/ili GP Ib/IX kompleks).

### **3.5.1.3. Test imobilizacije trombocitnih antigena pomoću monoklonskih protutijela (MAIPA)**

MAIPA je kvalitativna tehnika koja omogućuje detekciju antitrombocitnih protutijela. Koristeći monoklonska protutijela specifična za određeni antigen na trombocitima se određuje i postojanje autoantitijela i određivanje na koji su antigen na trombocitima usmjerena (16). Dolaskom novih tehnika, ova metoda je izgubila kliničku važnost zbog kompliciranog načina izvođenja testa.

## **3.6. TERAPIJSKI POSTUPAK KOD IMUNOTROMBOCITOPENIJE**

Postoji nekoliko linija liječenja ITP-a, a budući da se radi o autoimunoj bolesti početna terapija uključuje imunosupresiju.

### **3.6.1 Prva linija liječenja**

U prvoj liniji liječenja koriste se kortikosteroidi i intravenski imunoglobulini.

Nadoknada trombocita transfuzijom koncentrata trombocita primjenjuje se samo u slučaju vrlo ozbiljnog i po život opasnog krvarenja (16).

Terapija prednizonom 1mg/kg dnevno *per os* kroz 2 do 4 tjedna uz postupno smanjivanje doze nakon odgovora na liječenje pokazala se uspješnom u postizanju remisije bolesti (16,11). Moguće je primijeniti i metilprednizolon *per os* ili intravenski u ekvivalentnim kortikosteroidnim dozama (16). Primjena visokih doza deksametazona 40 mg dnevno kroz 4 dana u ciklusima koji se mogu ponavljati svakih 2-4 tjedna

također je pokazala dobar učinak u postizanju dugoročne remisije bolesti te je čak pokazala bolje rezultate u usporedbi s uobičajenim liječenjem prednisonom (11).

U slučajevima kada je kortikosteroidna terapija neučinkovita može se razmotriti liječenje primjenom intravenskih imunoglobulina (Ivlg). Preporučeno doziranje je 2mg/kg kroz 4 dana, dok je kod nekih bolesnika primjena Ivlg-a uz kortikosteroidnu terapiju pokazala njihov sinergistički učinak (22).

Ivlg se mogu primijeniti uz liječenje kortikosteroidima kada je potrebno hitno povišenje trombocita ili kada izostaje odgovor na terapiju kortikosteroidima (16).

### **3.6.2 Druga linija liječenja**

Druga linija je indicirana kod bolesnika koji nisu postigli odgovor ili je on izgubljen na prvu liniju terapije, te kod onih koji su ovisni o primjeni kortikosteroida. Rezultati kliničkih studija pokazuju povoljan učinak agonista trombopoetinskih receptora (TPO-agonisti), a moguća je i primjena rituksimaba kod odabranih bolesnika (16).

TPO agonisti su analozi trombopoetina koji se vežu za receptore na hematopoetskim stanicama i time potiču proliferaciju progenitora megakariocita i stvaranje trombocita. TPO agonist Romiplostim se veže izravno na mjesto vezanja TPO-a i stimulira zrelije prekursure trombocita, dok se Eltrombopag veže na transmembransko mjesto i djeluje u ranijem stadiju proizvodnje trombocita, stimulirajući prekursore megakariocita. Romiplostim se koristi u liječenju ITP-a, a Eltrombopag osim ove indikacije ima svoju primjenu i u liječenju aplastičnih anemija i bolesnika s HCV infekcijom koji se liječe interferonom i ribavirinom (23).

### **3.6.3 Treća i kasnije linije liječenja**

Nakon neuspjeha u liječenju konzervativnim metodama možemo koristiti splenektomiju (22). Splenektomija je indicirana barem 12-24 mjeseci od postavljanja

dijagnoze ITP-a jer se u tom periodu mogu još javiti spontane remisije bolesti (16).

Osim splenektomije moguća je i promjena TPO-agonista budući da dva lijeka koja su trenutno odobrena u Hrvatskoj imaju različit mehanizam djelovanja. Dakle, bolesnici koji nisu odgovorili na liječenje jedim od TPO-agonista, mogu pokušati terapiju s drugim. Također se u kasnijim linijama liječenja može primijeniti rituksimab u odabranih bolesnika ako dotad već nije primijenjen (16).

U bolesnika koji su rezistentni na terapiju može se razmotriti i primjena ostalih imunosupresiva poput azatioprina, mikofenolat mofetila, ciklosporina i ciklofosfamida, iako su rezultati kliničkih istraživanja primjene ovih lijekova u bolesnika s ITP-om oskudni (16).

## **4. HIPOTEZA**

Hipoteza ovog rada je da se testom specifičnih antitrombocitnih protutijela može sa sigurnošću postaviti dijagnoza imunosne trombocitopenije.

## 5. CILJEVI RADA

Cilj ovog rada je ispitati može li se dijagnoza ITP-a potvrditi testom otkrivanja specifičnih antitrombocitnih protutijela.

Specifični ciljevi rada su:

1. Utvrditi osjetljivost i specifičnost specifičnih antitrombocitnih protutijela u bolesnika s ITP-om odrasle dobi.
2. Utvrditi osjetljivost i specifičnost specifičnih antitrombocitnih protutijela u bolesnika s ITP-om pedijatrijske dobi.

## 6. ISPITANICI I METODE

U Kliničkom bolničkom centru Zagreb je provedeno retrospektivno istraživanje koje je obuhvatilo sve bolesnike s trombocitopenijom kojima je u zadanom periodu od godine dana učinjeno testiranje antitrombocitnih protutijela u sklopu obrade trombocitopenije.

U istraživanje su uključeni svi bolesnici čiji su uzorci obrađeni na antitrombocitna protutijela u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb od 1. siječnja do 31. prosinca 2020. godine, a koji su u vrijeme uzimanja uzorka imali trombocitopeniju. Trombocitopenija je definirana kao broj trombocita manji do  $150 \times 10^9/L$ .

Antitrombocitna protutijela su određena metodom imunofluorescencije na protočnom citometru za dokazivanje vezanih antitrombocitnih protutijela te metodom na mikrosferama. Pozitivan rezultat antitrombocitnih protutijela je bio onaj koji je za 3 standardne devijacije veći od negativne kontrole testa. Dokazana su vezana IgM i/ili IgG antitrombocitnih autoprotutijela, te slobodna antitrombocitnih autoprotutijela IgG razreda. U slučaju pozitivnih slobodnih antitrombocitnih autoprotutijela određena je njihova specifičnost prema GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa i/ili GP Ib/IX kompleksu.

Antitrombocitna protutijela specifična za ITP su bila pozitivna na GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa i/ili GP Ib/IX kompleksu.

Za određivanje antitrombocitnih protutijela svakom odraslom bolesniku je venepunkcijom uzeto 6 mL pune krvi s antikoagulansom (EDTA) i 6 mL pune krvi bez antikoagulansa. Djeci je uzet uzorak 3 mL pune krvi s antikoagulansom (EDTA) i 3



mL pune krvi bez antikoagulansa. U slučaju teške trombocitopenije tj. kod bolesnika koji su imali klinički značajno kvarenje, uzeta su 2 uzorka od 6 mL pune krvi s antikoagulansom (EDTA) i 6 mL pune krve bez antikoagulansa.

Bolesnicima su iz medicinske dokumentacije prikupljeni sljedeći podaci: dob, spol, broj trombocita kod započinjanja dijagnostičke obrade, konačna dijagnoza, broj trombocita na zadnjoj viziti, te rezultat testiranja na antitrombocitna protutijela.

Dijagnoza uzroka trombocitopenije je postavljena od strane nadležnog hematologa, te je kao takva preuzeta za potrebe ovog istraživanja. U sklopu ovog rada dijagnoze nisu revidirane niti su analizirani dijagnostički postupci na temelju kojih je dijagnoza postavljena.

Podaci su obrađeni deskriptivnim statističkim metodama.

## 7. REZULTATI

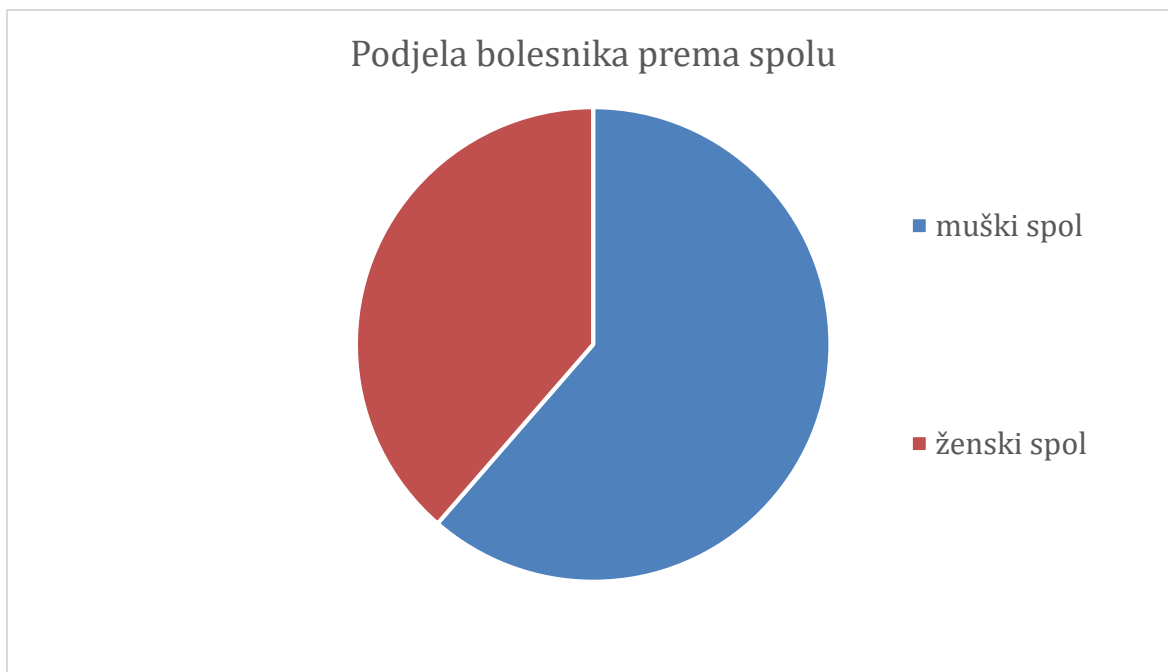
U istraživanje je uključeno 116 bolesnika. Od ukupnog broja, 99 (85,3%) bolesnika u vrijeme određivanja antitrombocitnih protutijela je imalo trombocitopeniju.

Sedamnaest (14,7%) bolesnika je u vrijeme određivanja antitrombocitnih testova imalo broj trombocita  $>150 \times 10^9/L$ , iako su na testiranje upućeni s dijagnozom trombocitopenije, te su bili isključeni iz daljnje analize.

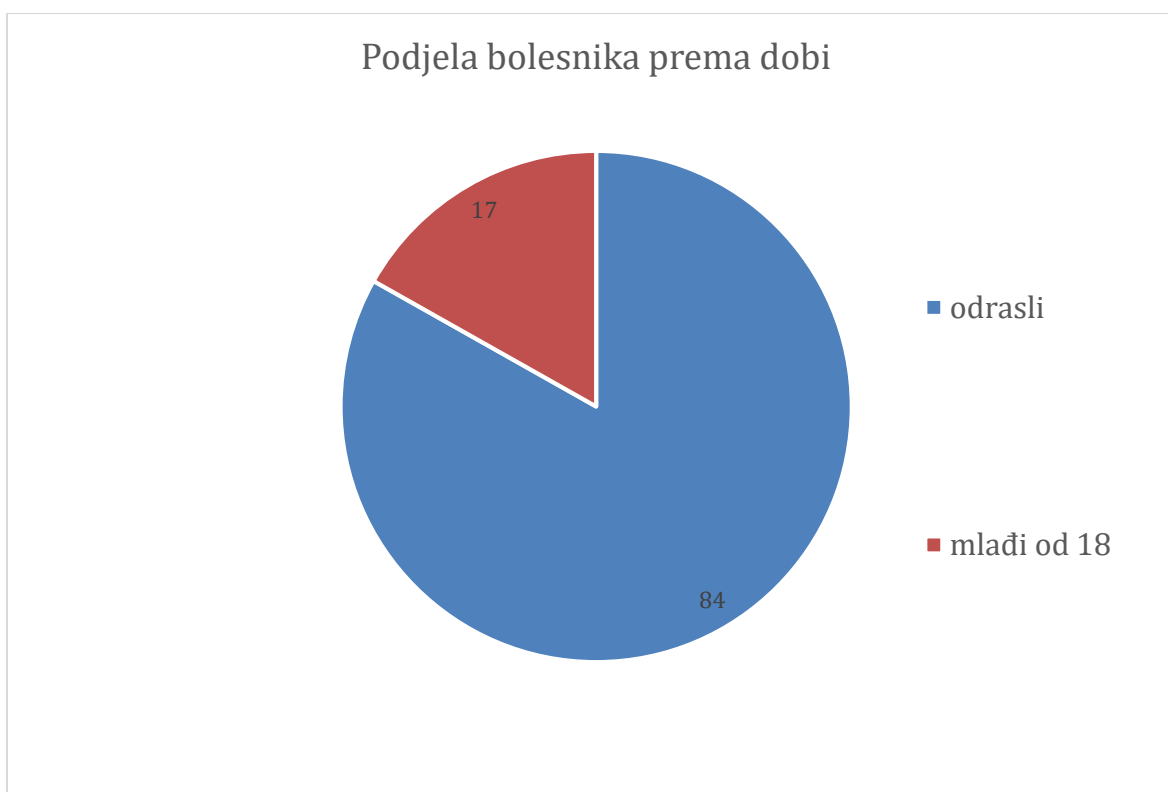
U skupini bolesnika s trombocitopenijom bio je 101 bolesnik, od čega 62 muškarca (61,3%) i 39 žena (38,6%). Medijan dobi je bio 44 godine (raspon 1 mjesec – 87 godina), a srednja vrijednost dobi 41,1 godina. Osamdeset i četiri (83,2%) bolesnika je bilo odrasle dobi, dok ih je 17 (16,8%) bilo mlađe od 18 godina.

Tablica 3. Karakteristike bolesnika

bolesnici, n	101
spol m/ž, n(%)	62 (61,3%) / 39 (38,6%)
dob, godine	
medijan (raspon)	44 (0 – 87)
aritmetička sredina	41,2
> 18 godina, n (%)	84 (83,2%)
≤ 18 godina, n (%)	17 (16,8%)

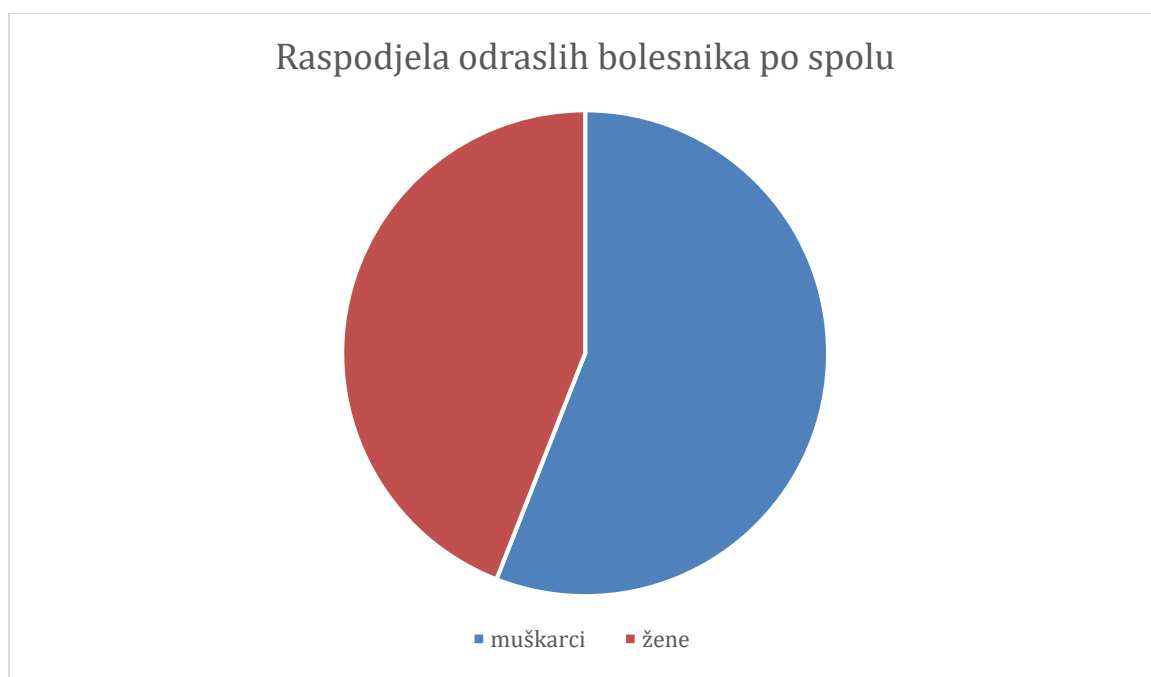


Slika 1. Podjela bolesnika prema spolu

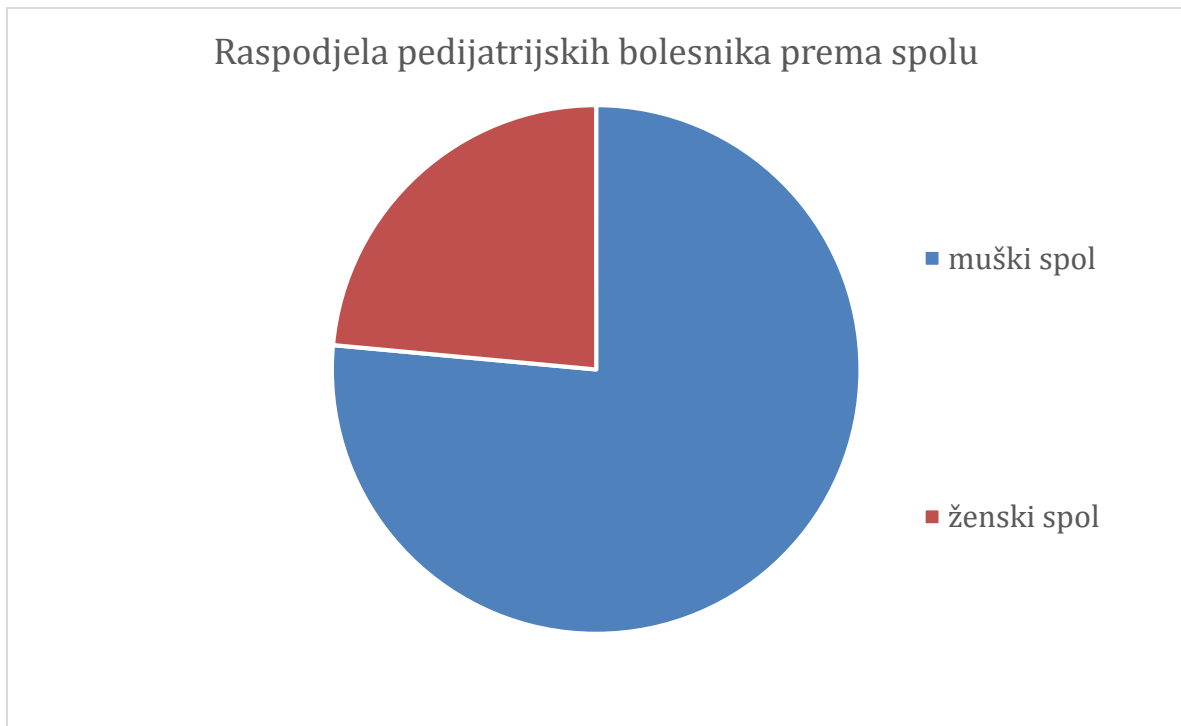


Slika 2. Podjela bolesnika prema dobi

Od 101 bolesnika ukupno, 84 ih je bilo odrasle dobi, od čega 47 (55,9%) muškaraca i 37 (44,1%) žena, dok je 17 bolesnika bilo pedijatrijske dobi. Maloljetna su bila četiri bolesnika ženskog i 13 muškog spola.



Slika 3. Podjela odraslih bolesnika po spolu.



Slika 4. Podjela pedijatrijskih bolesnika prema spolu

Od bolesnika kod kojih je dokazana trombocitopenija, dijagnoza ITP-a je postavljena u 29 (28,7%) bolesnika, dok su sekundarni uzroci trombocitopenije dokazani u 72 (71,3%) bolesnika.

Tablica 4. Konačna dijagnoza bolesti koja je uzrokovala trombocitopeniju kod testiranih bolesnika

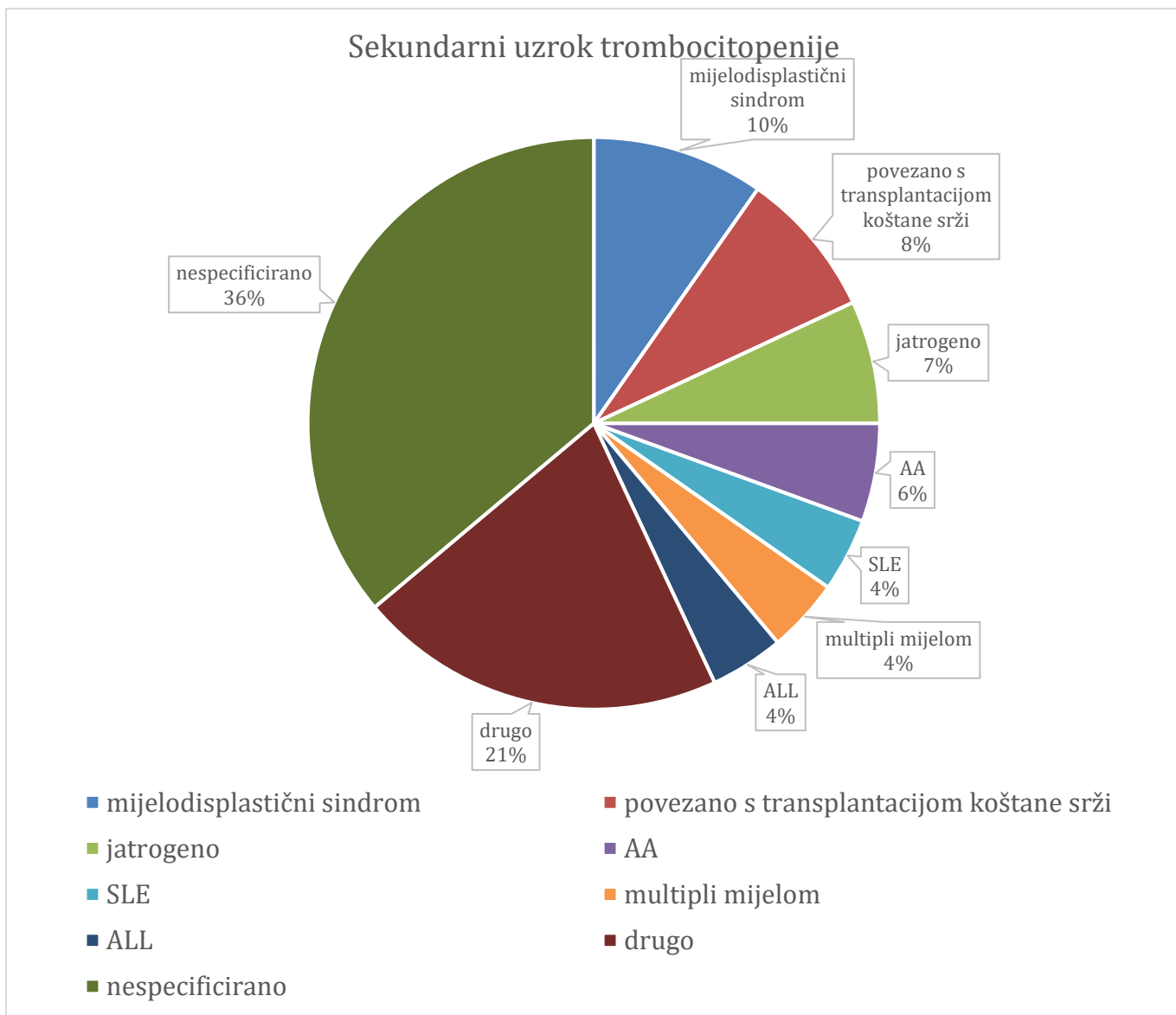
<b>uzrok trombocitopenije</b>	<b>N (%)</b>
ITP	29 (28,7%)
sekundarna trombocitopenija	72 (71,3%)

Od uzroka sekundarne trombocitopenije povezanih s oštećenjem koštane srži ističu se mijelodisplastični sindrom (MDS) - 7 bolesnika, stanje poslije transplantacije koštane srži - 6 bolesnika, aplastična anemija (AA) – 4 bolesnika, multipli mijelom (MM) - 3 bolesnika, akutna limfocitna leukemija (ALL) - 3 bolesnika, kronična limfocitna leukemija (CLL) - 2 bolesnika i akutna mijeloična leukemija (AML) - 1 bolesnik.

Kod nekih bolesnika se radi o sekundarno izazvanoj trombocitopeniji uslijed autoimunih bolesti, SLE (3 bolesnika) ili antifosfolipidnog sindroma (1 bolesnik).

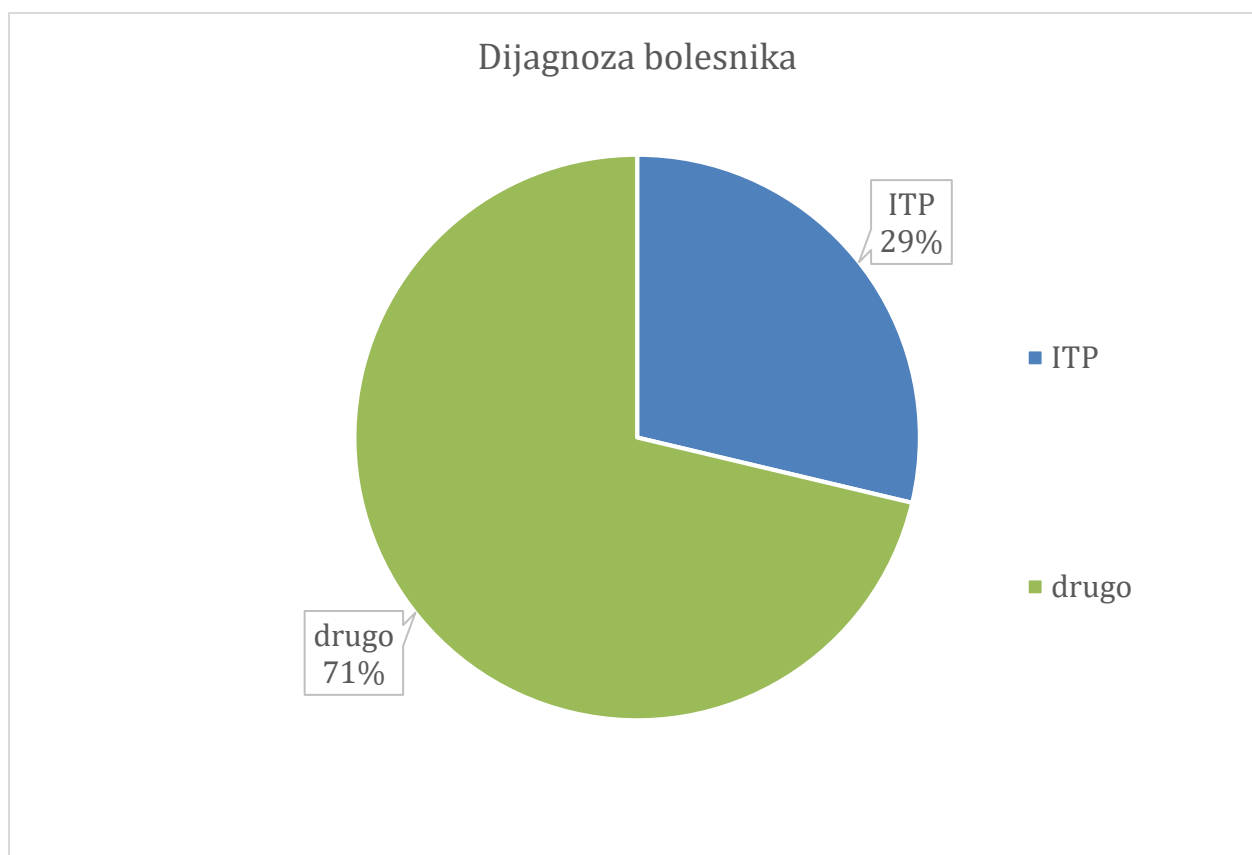
Tablica 5. Uzroci trombocitopenije osim ITP-a

<b>Poremećena proizvodnja trombocita (n)</b>	<b>Pojačano razaranje trombocita (n)</b>	<b>Drugi ili nepoznati mehanizam (n)</b>
MDS (7)	SLE (3)	jatrogeni uzrok (5)
povezano s transplantacijom koštane srži (6)	jetrena lezija + hepatitis (2 + 1)	nije specificiran uzrok (26)
AA (4)		drugo (6)
MM (3)		
ALL (3)		
hipoplazija koštane srži (2)		
CLL (2)		
AML (1)		
Burkittov limfom (1)		



Slika 5. Podjela sekundarnih uzroka trombocitopenije





Slika 6. Podjela bolesnika s obzirom na dijagnozu ITP-a

Pozitivna antitrombocitna protutijela su dokazana u 63 (62,4%) bolesnika.

Specifična protutijela tipična za ITP dokazana su u 4 (14%) bolesnika s postavljenom dijagnozom ITP-a, te kod 3 (4%) bolesnika sa sekundarnim uzrocima trombocitopenije. Opisana su u jednog bolesnika s aplastičnom anemijom, jednog s jatrogenim uzrokom trombocitopenije te kod bolesnika sa sistemskim eritematoznim lupusom.

Antitrombocitna protutijela koja nisu tipična za ITP su dokazana u 19 (66%) bolesnika s ITP-om te u 37 (51%) bolesnika s trombocitopenijom drugog uzroka.

Negativna antitrombocitna protutijela je imalo 6 (21%) bolesnika s ITP-om i 30 (43%) bolesnika s drugim uzrocima trombocitopenije.

Tablica 6. Nalaz protutijela kod bolesnika ovisno o uzroku trombocitopenije.

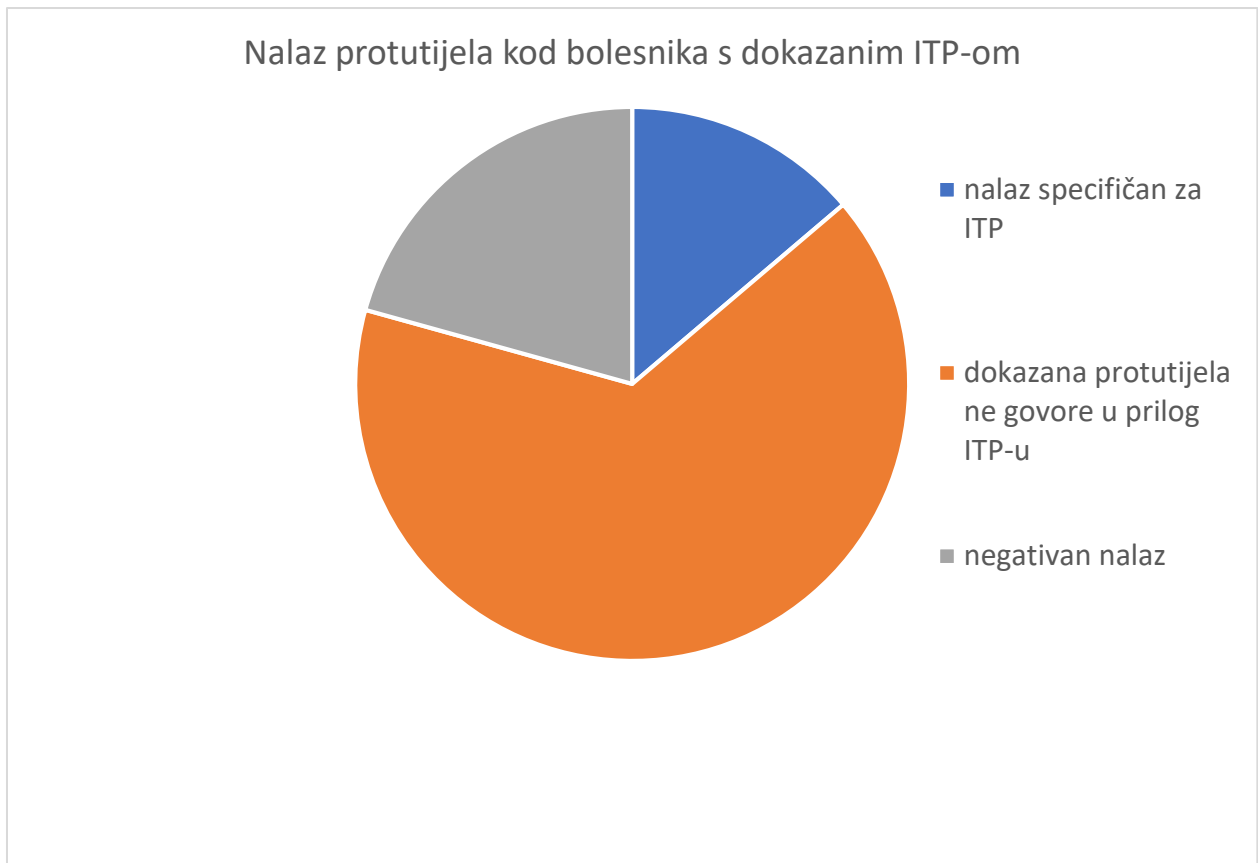
Antitrombocitna protutijela	pozitivna		negativna	ukupno
	specifična za ITP	nespecifična		
ITP, n(%)	4 (13.8%)	19 (79.3%)	6 (20.7%)	29 (100%)
drugi uzrok trombocitopenije, n(%)	3 (4.2%)	39 (54.1%)	30 (41.7%)	72 (100%)

Od 101 bolesnika, kojima je uz dijagnozu trombocitopenije učinjeno testiranje na antitrombocitna protutijela, kod njih 29 je postavljena dijagnoza ITP-a, a kod 72 bolesnika neka druga dijagnoza. Od 29 bolesnika s dijagnozom ITP-a njih 23 je imalo pozitivan nalaz antitrombocitnih protutijela, a šest bolesnika negativan nalaz. Kada smo analizirali vrstu protutijela u onih s pozitivnim nalazom antitrombocitnih protutijela, 4 bolesnika imalo protutijela specifična za ITP, dok je kod 19 bolesnika nalaz bio nespecifičan.

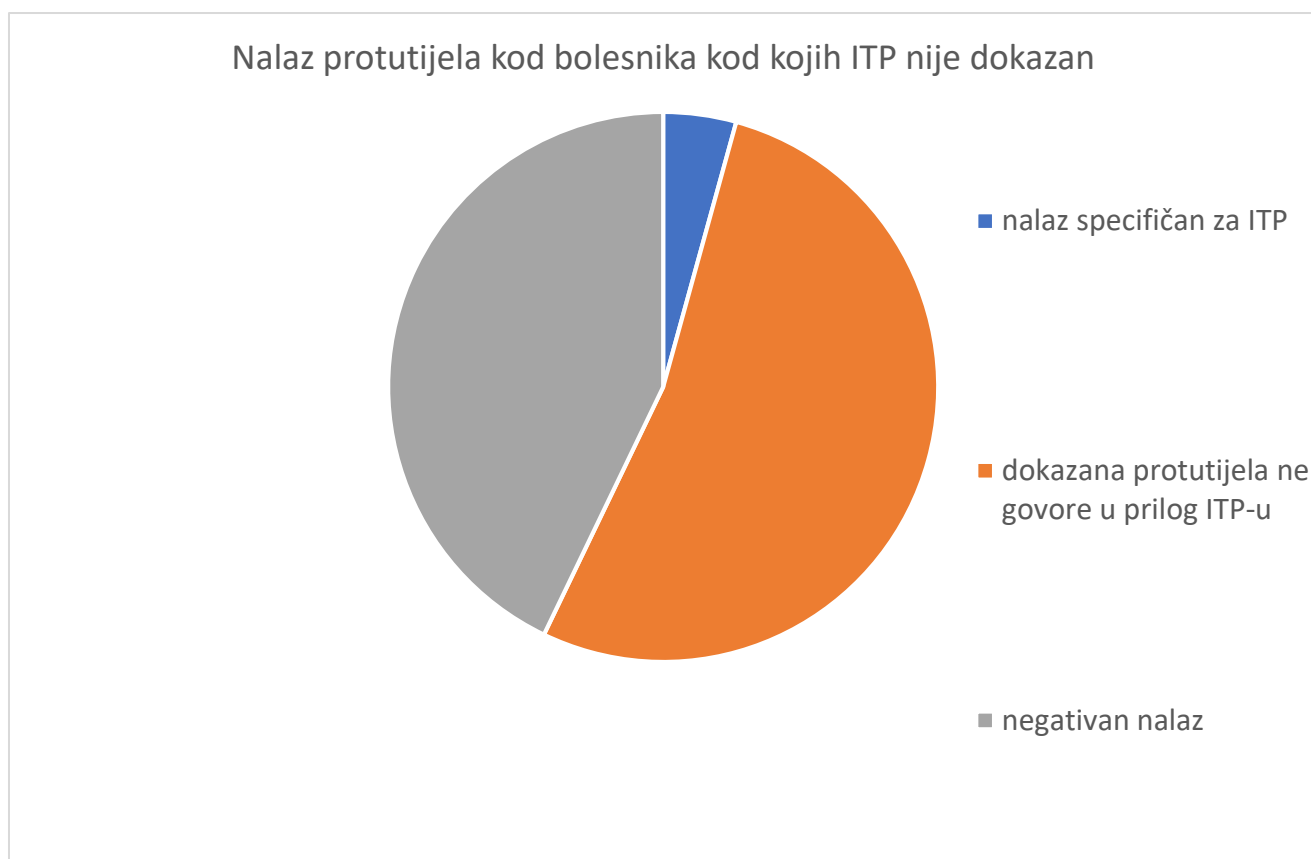
Od 72 bolesnika s nekom drugom postavljenom dijagnozom i trombocitopenijom, njih 42 je imalo pozitivan nalaz antitrombocitnih protutijela, a 30 bolesnika negativan nalaz.

Od 42 bolesnika s pozitivnim nalazom antitrombocitnih protutijela kod kojih ITP nije dijagnosticiran, kod tri bolesnika se radilo o nalazu protutijela specifičnim za ITP, dok je kod 39 bolesnika nalaz bio nespecifičan.

Iz tablice 6. slijedi da su naši rezultati pokazali da je osjetljivost testa antitrombocitnih protutijela u otkrivanju bolesnika s ITP-om 79,3%, dok je specifičnost testa iznosila 58,3%. Kada smo analizirali protutijela specifična za ITP, test je pokazao osjetljivost 20,7% i specifičnost 95,8%.



Slika 7. Rezultat testiranja antitrombocitnih protutijela kod bolesnika kojima je dokazan ITP



Slika 8. Rezultat testiranja antitrombocitnih protutijela kod bolesnika kojima nije dokazan ITP

U skupini bolesnika odrasle dobi (n=84) njih 25 (30%) postavljena je dijagnoza ITP-a, dok je kod njih 59 (70%) postojao drugi uzrok trombocitopenije.

Tablica 7. Podjela odraslih bolesnika prema trombocitopeniji u trenutku testiranja na antitrombocitna protutijela i dijagnozi ITP-a

	ITP	druga dijagnoza	ukupno
bolesnici s trombocitopenijom, n(%)	25 (30%)	59 (70%)	84 (100%)

Od odraslih bolesnika s trombocitopenijom, kod njih 47 (56%) bila su dokazana antitrombocitna protutijela. U skupini bolesnika s pozitivnim antitrombocitnim protutijelima, kod 21 (44,7%) bolesnika je postavljena dijagnoza ITP-a.

Trideset i sedam (44%) je bolesnika imalo negativan nalaz protutijela te je kod njih četiri (10,8%) postavljena dijagnoza ITP-a.

Od 59 bolesnika kod kojih ITP nije dokazan, dvoje je imalo nalaz protutijela specifičan za ITP, 30 je imalo nespecifična protutijela, a kod 27 bolesnika protutijela nisu dokazana.

Tablica 8. Nalaz protutijela kod odraslih bolesnika ovisno o uzroku trombocitopenije.

Antitrombocitna protutijela	pozitivna		negativna	ukupno
	specifična za ITP	nespecifična		
ITP, n(%)	4 (16%)	15 (60%)	6 (24%)	25 (100%)
drugi uzrok trombocitopenije, n(%)	2 (3.4%)	30 (50.8%)	27 (45.8%)	59 (100%)

Analizirajući samo skupinu odraslih bolesnika, osjetljivost i specifičnost testa nespecifičnih protutijela je iznosila 76% i 15,8%, dok je test specifičnih antitrombocitnih protutijela pokazao osjetljivost od 100%, ali nisku specifičnost od 26,3%

U grupi bolesnika pedijatrijske dobi (n=17) kod četvero (24%) bolesnika je postavljena dijagnoza ITP-a, dok je kod 13 (76%) bolesnika postojao drugi uzrok trombocitopenije.

Tablica 9. Podjela pedijatrijskih bolesnika prema trombocitopeniji u trenutku testiranja na antitrombocitna protutijela i dijagnozi ITP-a

	ITP	druga dijagnoza	ukupno
bolesnici s trombocitopenijom, n(%)	4 (24%)	13 (76%)	17 (100%)

Od pedijatrijskih bolesnika s trombocitopenijom, kod njih 14 (82,3%) bila su dokazana antitrombocitna protutijela. U skupini bolesnika s pozitivnim antitrombocitnim protutijelima, četvorici (28,6%) bolesnika je postavljena dijagnoza ITP-a.

Samo tri (21,4%) bolesnika imalo negativan nalaz protutijela, te niti jednom od njih nije postavljena dijagnoza ITP-a.

Od 13 bolesnika kod kojih ITP nije dokazan, jedan je imao nalaz protutijela specifičan za ITP, devet je imalo nespecifična protutijela, a kod tri bolesnika protutijela nisu dokazana.



Tablica 10. Nalaz protutijela kod pedijatrijskih bolesnika ovisno o uzroku trombocitopenije.

Antitrombocitna protutijela	pozitivna		negativna	ukupno
	specifična za ITP	nespecifična		
ITP, n(%)	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	4 (100%)
drugi uzrok trombocitopenije, n(%)	1 (7.7%)	9 (69.2%)	3 (23.1%)	13 (100%)

Analizirajući samo skupinu pedijatrijskih bolesnika, osjetljivost i specifičnost testa nespecifičnih protutijela je iznosila 30,8% i 100%, dok je test specifičnih antitrombocitnih protutijela pokazao osjetljivost od 0% i specifičnost od 100%.

Ograničenje ovog izračuna je u malom broju ispitanika ove populacije.

Tablica 11. Usporedba bolesnika s ITP-om i onih s drugim dijagnozama

	bolesnici s dijagnozom ITP-a	bolesnici s drugim dijagnozama
spol (m / ž)	16 / 13	46 / 26
odrasli / djeca, n	25 / 4	59 / 13
antitrombocitna protutijela, pozitivna/negativna, n	23 / 6	42 / 30
broj trombocita na zadnjem pregledu, uredan/trombocitopenija	10 / 19	19 / 53

## 8. RASPRAVA

Imunosna trombocitopenija (ITP) je relativno čest uzrok tromboctopenije kako kod odraslih tako i kod djece koju karakterizira su prolazan ili trajan pad broja trombocita, te povećan rizik krvarenja.

Dijagnoza ITP-a se postavlja isključivanjem sekundarnih uzroka trombocitopenije, kojih je mnogo, dok specifični test kojim bi se potvrdila dijagnoza ITP-a ne postoji.

Detaljna dijagnostička obrada pacijenta je zahtijevna i dugotrajna, a potreba za hitnim liječenjem vrlo često nužna. Bolesnici s teškom trombocitopenijom imaju povećani rizik ne samo ozbiljnih po život opasnih krvarenja iz sluznice probavnog ili genitourinarnog trakta, već i visok rizik intrakranijskog krvarenja.

Liječenje trombocitopenije ovisi o njezinoj etiologiji, tako da se terapijski pristup

trombocitopenijama uzrokovanim imunosnim mehanizmima i onima nastalih zbog nedostatnog stvaranja trombocita bitno razlikuje. U slučaju imunotrombocitopenije se zbog autoimunog mehanizma nastanka bolesti primjenjuju imunosupresivi, a nadoknada trombocita, koja je kod amegakariocitnih trombocitopenija često indicirana, se kod autoimunih izbjegava jer može dovesti do nove imunosne reakcije.

Postojanje laboratorijskog testa kojim bismo mogli potvrditi ITP u bolesnika značajno bi nam skratio i olakšao dijagnostičku obradu trombocitopenija.

Analiza antitrombocitnih protutijela je metoda koja se u dijagnostici trombocitopenija koristi već dugi niz godina (24-26), iako su se metode otkivanja specifičnih protutijela usavršavale kroz vrijeme (27,28).

U ovom radu smo istražili uloga antitrombocitnih protutijela u dijagnostičkoj obradi trombocitopenija kod bolesnika odrasle i pedijatrijske dobi. Naši rezultati su pokazali

da je osjetljivost specifičnih antitromboctnih protutijela usmjerenih na GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa i/ili GP Ib/IX kompleks kod pacijenata s trombocitopenijom niska, te da iznosi 13,8%, međutim ova protutijela imaju visoku specifičnost od 95,8% u postavljanju dijagnoze ITP-a.

Rezultati ovog istraživanja govore u prilog velike vrijednosti pozitivnog testa analize antitrombocitnih protutijela, te da se uz pravilnu obradu bolesnika i pozitivan nalaz s velikom sigurnošću može postaviti dijagnoza ITP-a. Međutim, zbog niske osjetljivosti testa negativan nalaz ne isključuje mogućnost dijagnoze ITP-a u bolesnika kod kojih su ostali mogući uzroci trombocitopenije isključeni.

Također smo pokazali da test nespecifičnih antitrombocitnih protutijela nema značajnu ulogu u postavljanju dijagnoze ITP-a.

Dobiveni se rezultati podudaraju s nekoliko ranije provedenih istraživanja koja su pokazala velik udio bolesnika s dijagnozom ITP-a kod kojih antitrombocitna protutijela nisu bila dokazana (20, 29, 30). U jednom istraživanju iz 2013. godine, Grimaldi i suradnici pokazali su kako je od ukupno 108 bolesnika s ITP-om njih 15 (14 %) imalo pozitivna antitrombocitna protutijela te je taj nalaz bio povezan s težim simptomima krvarenja, a ti su bolesnici bili skloniji razviti kroničan oblik ITP-a (29). U sistematskom preglednom radu o prisutnosti antitromboctnih protutijela u ITP-u pedijatrijske populacije koji je uključio 40 studija odnosno 1606 bolesnika, pokazala se umjerena osjetljivost (19-39%) i visoka specifičnost (80-100%) testa za postavljanje dijagnoze ITP-a (30).

Smatra se da se slučajevima negativnog nalaza antitrombocitnih protutijela radi o drugim mehanizmima nastanka trombocitopenije poput uništavanja trombocita citotoksičnim T-limfocitima (20).

Prisutnost antitrombocitnih protutijela se prema nekim istraživanjima pokazala i kao prognostički pokazatelj tijeka bolesti. U istraživanju Schmidta i suradnika, praćena je longitudinalna kohorta od 179 pedijatrijskih bolesnika te je primijećen brži rast trombocita kod djece s dokazanim IgM protutijelima i bolji odgovor na terapiju Ivlg (31).

Prema drugom istraživanju koje je uključilo bolesnike starije od 16 godina s postavljenom dijagnozom ITP-a, njih ukupno 69, odgovor na terapiju Ivlg ovisio je o vrsti protutijela koja su bila prisutna pa je odgovor bio bolji kod bolesnika s pozitivnim anti-GPIIb/IIIa protutijelima nego kod bolesnika s anti-GPIb/IX protutijelima. Također, bolesnici s novodijagnosticiranim ITP-om imali su bolji odgovor od onih s kroničnim oblikom bolesti, dok spol, dob i primarna odnosno sekundarna priroda bolesti nisu imali utjecaj na učinkovitost Ivlg u terapiji (32).

Naši rezultati također ukazuju na moguću razliku u osjetljivosti i specifičnosti testa specifičnih antitrombocitnih protutijela između odrasle i pedijatrijske populacije, iako naše zaključke temeljimo na vrlo malom broju pedijatrijskih bolesnika. Naime, etiologija i klinički tijek bolesti se kod djece značajno razlikuje od ITP-a odrasle dobi. ITP je kod djece često potaknut virusnim infekcijama, te vrlo često prolazi spontano. Među našim bolesnicima pedijatrijske dobi s ITP-om, specifična protutijela nisu bila dokazana niti kod jednom bolesnika, iako je u objavljenim rezultatima drugu autora postotak pozitivnih antitrombocitnih protutijela oko 30% (33).

Naravno, potrebna su daljnja istraživanja na većem broju bolesnika kako bismo sa sigurnošću mogli procijeniti ulogu antitrombocitnih protutijela u postavljanju dijagnoze ITP-a, kako u adultnoj, tako i u pedijatrijskoj populaciji. Također, potrebno je istražiti kakav je utjecaj specifičnih antitrombocitnih protutijela na odgovor na liječenje ITP-a, kako imunosupresivnim lijekovima, tako i TPO agonistima.

## 9. ZAKLJUČAK

ITP je bolest čija se dijagnoza postavlja isključivanjem drugih mogućih uzroka trombocitopenije. Test specifičnih antitrombocitnih protutijela usmjerenih na GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa i/ili GP Ib/IX kompleksu pokazao je visoku specifičnost, ali nisku osjetljivost kako u odrasloj tako i u pedijatrijskoj populaciji. Kod bolesnika s pozitivnim rezultatom testa možemo sa sigurnošću postaviti dijagnozu ITP-a, iako nažalost velik broj bolesnika s ITP-om ima negativan rezultat testiranja. Naši rezultati ukazuju da bi razvoj metoda koji bi s većom osjetljivošću mogli dokazati ITP značajno pomogao u dijagnostičkoj obradi bolesnika s trombocitopenijom. Dodatna vrijednost tog testa bila i njegova uloga u procjeni odgovora na terapiju.

## **10. ZAHVALE**

Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Ani Boban na svojoj pomoći, savjetima i strpljenju koje je imala kroz cijelu akademsku godinu za pisanje ovog rada.

Također želim zahvaliti dr. Gordani Tomac s Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju koja mi je pomogla u skupljanju i tumačenju nalaza antitrombocitnih protutijela.

Velike zahvale i mojoj obitelji i bliskim prijateljima na podršci kroz zadnjih 6 godina, jedva sam samu sebe trpila pa znam da ni njima nije bilo lako.

## **11. LITERATURA**

1. Megakariociti. [Internet, pristupljeno 24.6.2021.] Dostupno na:  
<https://sh.wikipedia.org/wiki/Megakariocit>
2. Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol.* 2012;(210):3-22.
3. Italiano JE Jr. Unraveling mechanisms that control platelet production. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39(1):15-24.
4. Vinholt PJ. The role of platelets in bleeding in patients with thrombocytopenia and hematological disease. *Clin Chem Lab Med.* 2019;57(12):1808-1817.
5. Hemostaza. Zupančić Šalek S., Stančić V. U: Vrhovac B., Jakšić B., Reiner Ž., Vucelić B. *Interna medicina. Četvrto, promijenjeno i dopunjeno izdanje.* Zagreb: Naklada Ljevak;2008: Str. 956-72
6. A cell-based model of hemostasis. Hoffman M, Monroe DM 3rd. *Thromb Haemost.* 2001 Jun;85(6):958-65
7. Gauer RL, Braun MM. Thrombocytopenia. *Am Fam Physician.* 2012;85(6):612-622.
8. Bolesti uzrokovane poremećajima hemostaze. Zupančić Šalek S. U: Vrhovac B., Jakšić B., Reiner Ž., Vucelić B. *Interna medicina. Četvrto, promijenjeno i dopunjeno izdanje.* Zagreb: Naklada Ljevak;2008: Str. 956-72
9. Bolesti krvotvornih organa i limfnih čvorova. Dominis M., Nola M., Gašparov S., Škrtić A., Dotlić S., Ilić I. i sur. U: Damjanov I., Seiwert S., Jukić S., Nola M. *Patologija. Peto prerađeno i dopunjeno izdanje.* Zagreb: Medicinska naklada;2018: Str. 303-51
10. Kistangari G, McCrae KR. Immune thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013;27(3):495-520.



11. Lambert MP, Gernsheimer TB. Clinical updates in adult immune thrombocytopenia. *Blood*. 2017;129(21):2829-2835.
12. Fogarty PF. Chronic immune thrombocytopenia in adults: epidemiology and clinical presentation. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(6):1213-1221.
13. Audia S, Mahévas M, Samson M, Godeau B, Bonnotte B. Pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Autoimmun. Rev*. 2017;16(6):620–32.
14. Zufferey A, Kapur R, Semple JW. Pathogenesis and Therapeutic Mechanisms in Immune Thrombocytopenia (ITP). *J Clin Med*. 2017;6(2):16. Published 2017 Feb 9
15. McMillan R. Antiplatelet antibodies in chronic immune thrombocytopenia and their role in platelet destruction and defective platelet production. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(6):1163-1175.
16. Pulanić D, Zupančić-Šalek S, Boban A, Ostojić-Kolonić S, Galušić D, Valković T. Nadopuna smjernica za dijagnostiku i liječenje imunosne trombocitopenije u odraslih. *Bilten Krohema*. 2021;vol 13. 52-54
17. Nagalla S, Sarode R. Recent advances in understanding and management of acquired thrombocytopenia. *F1000Res*. 2018;7:68. Published 2018 Jan 17.
18. Stasi R. How to approach thrombocytopenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:191-197.
19. Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju. [Internet, pristupljeno 8.6.2021.] Dostupno na: <https://www.kbc-zagreb.hr/klinicki-zavod-za-transfuzijsku-medicinu-i-transplantacijsku-biologiju.aspx>
20. McMillan R. Antiplatelet antibodies in chronic adult immune thrombocytopenic purpura: assays and epitopes. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003;25 Suppl 1:S57-S61.

21. McMillan R, Tani P, Millard F, Berchtold P, Renshaw L, Woods VL Jr. Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood*. 1987;70(4):1040-1045.
22. S. Ostojčić Kolonić, M. Bogeljić Patekar, V. Milunović Dijagnostički pristup i liječenje imune trombocitopenije u odrasloj dobi. *Acta Med Croatica*, 61 (2013) 3-11
23. Ghanima W, Cooper N, Rodeghiero F, Godeau B, Bussel JB. Thrombopoietin receptor agonists: ten years later. *Haematologica*. 2019;104(6):1112–23.
24. Kelton JG, Steeves K. The amount of platelet-bound albumin parallels the amount of IgG on washed platelets from patients with immune thrombocytopenia. *Blood*. 1983;62(4):924-927.
25. Mueller-Eckhardt C, Kayser W, Mersch-Baumert K, et al. The clinical significance of platelet-associated IgG: a study on 298 patients with various disorders. *Br J Haematol*. 1980;46(1):123-131.
26. Warner MN, Moore JC, Warkentin TE, Santos AV, Kelton JG. A prospective study of protein-specific assays used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 1999;104(3):442-447.
27. Arnold DM, Santoso S, Greinacher A, On behalf of the Platelet Immunology Scientific Subcommittee of the ISTH. Recommendations for the implementation of platelet autoantibody testing in clinical trials of immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost*. 2012;10(4):695-697.
28. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood*. 1987;70(6):1722-1726.

29. Grimaldi D, Canouï-Poitaine F, Croisille L, et al. Antiplatelet antibodies detected by the MAIPA assay in newly diagnosed immune thrombocytopenia are associated with chronic outcome and higher risk of bleeding. *Ann Hematol.* 2014;93(2):309-315.
30. Schmidt DE, Lakerveld AJ, Heitink-Pollé KMJ, et al. Anti-platelet antibody immunoassays in childhood immune thrombocytopenia: a systematic review. *Vox Sang.* 2020;115(4):323-333.
31. Schmidt DE, Heitink-Polle KMJ, Porcelijn L, et al. Anti-platelet antibodies in childhood immune thrombocytopenia: Prevalence and prognostic implications. *J Thromb Haemost.* 2020;18(5):1210-1220.
32. Rogier T, Samson M, Mourey G, et al. Antiplatelet Antibodies Do Not Predict the Response to Intravenous Immunoglobulins during Immune Thrombocytopenia. *J Clin Med.* 2020;9(6):1998. Published 2020 Jun 25.
33. Berchtold P, McMillan R, Tani P, Sommerville-Nielsen S, Blanchette VS. Autoantibodies against platelet membrane glycoproteins in children with acute and chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1989;74(5):1600-1602.

## 12. ŽIVOTOPIS

Moje ime je Marcela Romić. Rođena sam 22.09.1996. godine u Zagrebu gdje sam i odrasla. Pohađala sam OŠ Vrbani od 2003. do 2011. godine te zatim V. gimnaziju do 2015 godine. Nakon toga sam upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje sam za vrijeme studiranja bila demonstrator na Katedri za Fiziologiju i Imunologiju u akademskim godinama 2018./2019. i 2019./2020. Koautorica sam nekoliko članaka sa sudjelovanjem na međunarodnim kongresima. Aktivno se služim engleskim i talijanskim jezikom i pasivno njemačkim jezikom.