

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

ANTIČŪNŲ PRIEŠ REZUS KRAUJO GRUPĖS ANTIGENUS
ATSIRADIMAS IR PAPLITIMAS

Magistrantė MILDA KARANAUSKAITĖ

(parašas)

Darbo vadovė:
Lekt. dr. Loreta Bagdonaitė

(parašas)

Konsultantė:
Vida Betingienė

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab. dr., prof. Z. Kučinskienė

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

2008

TURINYS

SUTRUMPINIMAI	4
1. ĮVADAS	5
2. LITERATŪROS APŽVALGA:	
2.1. Kraujo grupių ir Rhesus faktoriaus tyrimų istorinė apžvalga	6
2.2. Kraujo grupių antigenai ir antikūnai	7
2.2.1. Kraujo grupių antigenai	7
2.2.2. Kraujo grupių antikūnai	12
2.2.2.1. Antikūnų struktūra	13
2.2.2.2. Svarbiausios kraujo grupių imunoglobulinų klasės	15
2.3. Antigenų ir antikūnų sąveikos nustatymo <i>in vitro</i> būdai	17
2.4. Rhesus kraujo grupių sistema	18
2.4.1. Rh kraujo grupių sistema	18
2.4.2. Rh nomenklatūra	20
2.4.3. Rh sistemos antigenai	22
2.4.4. Kas tai yra Rhesus faktorius?	24
2.4.5. Poligeninis D antigeno paveldėjimas	27
2.5. Antikūnų prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus, tipai	28
2.6. Antikūnai prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus	35
2.7. Aloantikūnų prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus atsiradimas po hemotransfuzijų	37
2.8. Anti – Rh antikūnų sukeltos komplikacijos	38
3. Darbo tikslas ir uždaviniai	41
4. EKSPERIMENTINĖ DALIS:	
4.1. Tyrimo medžiaga	42
4.1.1. Tiriamosios grupės	42
4.1.2. Tiriamosios medžiagos surinkimas	42
4.2. Tyrimo metodai	42
4.2.1. Reagentų aprašas	42
4.2.2. Antikūnų (alo-, auto-) paieška	43

4.2.3 Antikūnų identifikavimas	44
4.3. Statistinė duomenų analizė	44
5. DARBO REZULTATAI:	
5.1. Aloantikūnų ir autoantikūnų atsiradimas po hemotransfuzijų	45
5.2. Rėzus kraujo grupės aloantikūnų ir autoantikūnų paplitimas	50
5.3. Antikūnų prieš Rėzus kraujo grupių sistemos antigenus pasiskirstymas pagal susirgimo pobūdį.	54
6. REZULTATŲ APTARIMAS	58
7. IŠVADOS	61
SUMMARY	62
LITERATŪROS SĄRAŠAS	64
DARBO PRIEDAS	69

SUTRUMPINIMAI

AIHA – autoimuninė hemolizinė anemija.

Ag – antigenas.

Ak – antikūnas.

APLC – nuo antikūnų priklausoma limfocitotoksinė reakcija.

a. r. – amino rūgštis.

DIK – diseminuota intravaskulinė koaguliacija.

DNR – *deoksiribonukleininė rūgštis* (deoksiribobranduolio rūgštis).

Ig – imunoglobulinas.

MAK – membraną atakuojantis kompleksas.

neig. arba (-) – neigiamas.

NHL – naujagimių hemolizinė liga.

NK – natūralūs kileriai.

Rh – rhexus.

RNR – *ribonukleininė rūgštis*.

ŠAA – šalčio antikūnai.

ŠIA – šilumos antikūnai.

teig. arba (+) – teigiamas.

ŽAG – žmogaus antioglobulinas (angl. *antihuman globulin* – AHG).

1. ĮVADAS

Moderniojoje medicinoje kraujo ir jo komponentų perpylimas daugeliu atvejų yra vienas iš gydymo metodų (be medikamentinio ar chirurginio gydymo metodų). Be šios procedūros daug medicininių manipuliacijų būtų visiškai neįmanomos arba labai sunkiai įvykdomos. Perpilti kraują ar jo sudedamąsias dalis kartais būtina nukraujavus, sergant piktybinėmis ir infekcinėmis ligomis, sutrikus krešėjimui ir kitais atvejais [13, 68].

Kraujo perpylimai buvo atliekami labai seniai. Jau XVII amžiaus pradžioje įrodžius, kad kraujas organizme teka ratu, buvo atlikti pirmieji bandymai jį perpilti. Deja, daugelis bandymų tai atlikti baigdavosi mirtimi, nes kraujo kūneliai sulipdavo – agliutinuodavo. Todėl metai iš metų buvo siekiama išsiaiškinti šių nesėkmių priežastis [11, 44, 10, 41].

Šiuo metu žinoma kaip 700 eritrocitų kraujo grupių antigenų. Antigenai, hemotransfuzijos metu patekę į organizmą, kuris neturi tokių antigenų, gali indukuoti specifinių antikūnų sintezę arba sukelti jau esančių antikūnų reakciją. Klinikiniu požiūriu, specifinių antikūnų prieš kliniškai svarbių kraujo grupių antigenus susidarymas yra vienas iš svarbiausių hemotransfuzijos rizikos veiksnių [13, 10, 62].

Norint užtikrinti saugią transfuziją būtina yra nustatyti antikūnus, atsirandančius prieš kliniškai svarbius kraujo grupių antigenus, kurie gali sukelti potransfuzines hemolizines reakcijas [2].

Pirmasis kontaktas su svetimais kraujo grupių antigenais dažniausiai nesukelia jokių, kliniškai reikšmingų pasekmių (išimtytys yra ABO kraujo grupių sistemos izoagliutininai, kurie A, B ir O kraujo grupių žmonėms randami ir be kontakto su antigenais). Po kurio laiko aloantikūnai prieš eritrocitų antigenus recipientų kraujyje jau nebeaptinkami, todėl po pakartotinio kontakto su tuo pačiu antigenu, po hemotransfuzijos, aloantikūnai sukels perpiltų eritrocitų hemolizę (hemolizinę potransfuzinę reakciją) [13, 62, 69].

2. LITERATŪROS APŽVALGA

Kraujo grupių ir Rexus faktoriaus tyrimų istorinė apžvalga

1628 m. Harvėjus atrado kraujotakos ratą [20, 36].

1665 m. Laueris (Anglija) sėkmingai atliko kraujo perpylimą šunims.

1667 m. Denis ir Emerezas (Prancūzija) ėriuko kraują perpylė ligoniui, bet tokie bandymai labai dažnai baigdavosi mirtimi, todėl hemotransfuzijomis buvo nusivilta [36].

Iki XX amžiaus pradžios, kraujas ir jo funkcijos buvo silpnai suprantamos, mažai kas ką apie jas žinojo. Bandant išsiaiškinti sunkias kraujo netekimo problemas traumų metu, buvo bandoma perpilti kraują tokiems pacientams netekusiems daug kraujo, iš kito žmogaus ar netgi iš gyvūno. Kai kuriais atvejais tai pavykdavo ir pacientas pasveikdavo. Daugeliu kitų atvejų, vis dėlto kraujo transfuzijos iš tikrųjų labiau pakenkdavo pacientui nei jam padėdavo. Netgi dažnai tai baigdavosi mirtimi. Niekas negalėjo numanyti, kokia reakcija gali įvykti atlikus kraujo perpylimą. Todėl baigiantis XIX amžiui, daugelis Europos tautų kraujo perpylimo atlikimo techniką paskelbė neteisėta [25].

Apie 1900 metus, austrų – amerikiečių fizikas Karlas Landštaineris (1868 – 1943) atrado kraujo atmetimo paaiškinimo fenomeną. Jis aptiko tai, kad žmogaus kraujo serumas (skystoji kraujo dalis supanti raudonąsias kraujo ląsteles) gali būti padalinta į keturias kategorijas priklausomai nuo jų sugebėjimo sukelti raudonųjų kraujo ląstelių agliutinaciją. Jis davė šioms grupėms A, B, AB ir O pavadinimus, remiantis tuo, kokią krešėjimo antigeną jos turi, žinoma jei iš viso tokį turi [49, 25, 68].

K. Landštaineris kartu su savo kolega A. S. Wieneriu 1940 m. atrado Rexus kraujo grupių sistemą, kai tyrimų metu suleido triušiams Rexus beždžionės kraujo. Šie mokslininkai tuomet pastebėjo, kad kraujo infekcijos iš Rexus beždžionės triušiu sukėlė jo kraujo serumo komponentuose antigeninę reakciją. Jie įrodė, kad triušiams, kurie buvo imunizuoti Rexus beždžionės raudonosiomis kraujo ląstelėmis, pradėjo gamintis antikūnai, kurie taip pat agliutinoja ir daugelio žmonių raudonąsias kraujo ląsteles [49].

Metais anksčiau (1939 m.), F. Levinas ir R. Stetsonas aprašė atvejį, kuomet motinai, kuri neturėjo Rexus antigeno D (Rh -) pagimdžiusiai negyvą kūdikį, kuris mirė

dėl sunkios agliutinacijos reakcijos, iki gimdymo buvo perpiltas jos vyro kraujas. Tyrėjai patikrino moters kraujo serumą ir nustatė, kad šis serumas reaguoja su 77% donoro (t.y. jos vyro) kraujo eritrocitais. Tyrinėjant šį atvejį, mokslininkai padarė išvadą, kad motina pažeista jos pačios nešioto vaisiaus krauju. Tas pats antigenas, kuris buvo aptiktas vaisiaus kraujyje, vėliau buvo identifikuotas ir kūdikio tėvo (moters vyro) kraujyje. Šie bandymai leido paaiškinti tokią moters kraujo reakciją į vyro perpilamą kraują. Jų padaryta išvada buvo teisinga ir vėliau jie realizavo ją, kai po metų (1940 m.) buvo atrastas tas Rhexus antigenas. Antikūnai, kurie buvo aptikti negyvajame kūdikiyje, parodė, kad jie yra identiškai anti – Rh antikūnams, kurie buvo pagaminti eksperimentuose su jūros kiaulytėmis bei triušiais ir kuriuos tik vėliau atrado K. Landštaineris ir A. S. Wieneris [29].

Rhexus faktoriaus svarba netrukus buvo patvirtinta vis tolimesniais tyrinėjimais ir bandymais. Dr. Filipas Levinas, dirbantis Newark Beth Izraelio ligoninėje, įrodė ryšį tarp Rhexus faktoriaus ir pasaulyje paplitusios embrioninės eritroblastozės, o A. S. Wieneris įrodė, kad neigiamas šios reakcijos poveikis yra dėl netinkamų kraujo transfuzijų ir Rh faktoriaus nesuderinamumo. A. S. Wieneris tuo metu vadovavo mainų transfuzijoms kovojant su embrionine eritroblastoze, kuria sirgdavo vos tik gimę kūdikiai. Ši transfuzinė technika išgelbėjo gyvybes daugeliui tūkstančių naujagimių.

Drs. Neva Abelson ir L. K. Diamond bendrininkavo atrandant paprastą Rhexus faktoriaus testą, kuris vėliau buvo labai plačiai taikomas visame pasaulyje.

1922 m. Lietuvoje pirmą kartą atliktas kraujo perpylimas (Kaune, prof. Kuzma).

1975 m. P. Tuppeetas ir R. Sangeris pasiūlė antigeno kategorijų klasifikaciją [70].

Kraujo grupių antigenai ir antikūnai

Kraujo grupių antigenai

Antigenai (gr. anti – prieš, genos – kilmė) - tai organizmo medžiaga, kuri turi savyje svetimos genetinės informacijos požymių ir patekusi į organizmą, stimuliuoja imuninį organizmo atsaką, sužadina specifines imunines humoralines ar/ ir ląstelines reakcijas, ypač antikūnų gaminimą [46, 38].

Apytikriai apie 700 skirtingų kraujo grupių antigenų yra identifikuota žmogaus raudonųjų kraujo ląstelių paviršiuje. Biocheminė analizė parodė, kad daugeliui, gamtoje aptiktų kraujo grupių antigenų būdinga apibrėžta cheminė struktūra [21]. Pagal ją šie antigenai gali būti glikoproteinai, glikolipidai arba struktūriniai baltymai [1, 4, 46, 21]. Kai kuriais atvejais kraujo grupių specifiškumas yra apibrėžiamas pagal prisijungusią karbohidrato liekaną. Taip pat jie yra koduojami genų (determinuoti). Yra kelios išimties, kuomet kraujo grupių antigenai tampa neatskiriama ląstelės membranos struktūrine dalimi. Pirmia, jie, būdami eritrocitų membranų struktūrine dalimi, patekę į organizmą kuris neturi šio antigeno, (t.y. perpylus netapatą kraujo eritrocitų), geba inicijuoti imuninį atsaką ir skatinti specifinių antikūnų gamybą, o šie gali agliutinuoti eritrocitus. Antra, kraujo grupių antigenai gali sukelti imuninį atsaką (skatinti antikūnų gamybą) kai patenka į organizmą, kuris neturi šio antigeno ir jį atpažįsta kaip svetimą [21]. Jei antigenas sukelia imuninį atsaką, jis vadinamas imunogenu, o jei prieš antigeną nesigamina antikūnų, toks antigenas vadinamas tolerogenu [46]. Antigeno specifiškumą (sugebėjimą specifiškai sąveikauti su antikūnais) sąlygoja antigeno molekulės veiklioji sritis – antigeninės determinantės (arba epitopai), kurie sukelia imuninį atsaką ir nekovalentiškai jungiasi su antikūnų aktyviaisiais centrais – paratopais. Taigi, epitopai lemia antigeno specifiškumą. Individualiems kraujo grupių antigenams būdingas nevienodas epitopų kiekis [1, 46].

Kiti veiksniai, lemiantys kraujo ląstelių antigenų imunogeniškumą yra:

1. *Antigeno dydis* – kuo didesnė antigeno molekulinė masė, tuo stipresnė jo sukeliama reakcija ir atvirkščiai;
2. *Antigeno dozė* – jei antigenas veikia nedidelėmis dozėmis, gali atsirasti tolerantiškumas;
3. *Trukmė* – jei antigenas veikia trumpai, imuninė sistema gali jo neatpažinti;
4. *Recipientų amžius* – bėgant metams reakcija į eritrocitų antigenus silpnėja.

Įvairūs kraujo ląstelių antigenai fetaliniu periodu susiformuoja gana skirtingu laiku ir šis procesas kartais nesibaigia net antraisiais gyvenimo metais. Tai svarbu ne tik diagnostiniu, bet ir sukeltų komplikacijų pasireiškimo požiūriu: jei antigenai fetaliniu

periodu susiformuoja pakankamai anksti, tai ir galimų komplikacijų tikimybė yra didesnė [68].

Genai, atsakingi už eritrocitų antigenų sintezę, išsidėstę viename ar keliuose, tarpusavyje susijusiuose, atitinkamų chromosomų lokusuose (1 lentelė). Krosingoverio atvejai yra labai reti, taigi šie antigenai paveldimi tiksliai pagal Mendelio dėsnius. Kraujo grupių antigenai priklauso polimorfinėms sistemoms, kurios yra genetiškai viena nuo kitos nepriklausomos ir reguliuojamos atitinkamų alelinių genų. Dauguma šių genų turi du alternatyvius alelius, kurie gali būti homozigotiniai arba heterozigotiniai abiejuose chromosomų porų haplotipuose. Šie aleliai reguliuoja eritrocitų antigenų ekspresiją dominantiniu, recesyviniu arba kodominantiniu būdu. Už baltyminės kilmės antigenų sintetinimą atsakinga tik nedidelė atitinkamo geno dalis, tuo tarpu sintetinant angliavandenių turinčius antigenus, būtina kelių genų sąveika. Dauguma eritrocitinių antigenų sistemų yra baltyminės kilmės (1 lentelė).

Klinikinė ir biologinė kraujo grupių antigenų svarba:

1. Biologinė eritrocitų antigenų reikšmė:

- a) kraujo grupių antigenai yra žmogaus individualumo išraiška;
- b) eritrocitų antigenai padeda išlaikyti ląstelės vientisumą, svarbūs brendimui bei išlikimui;
- c) antigenai, būdami eritrocitų membranų struktūrine dalimi, per membranas perneša anijonus (Diego kraujo grupės antigenai), perneša vandenį (Colton sistemos antigenai), transportuoja šlapalą (ABO, I, i, Kidd sistemų antigenai), gali aktyvinti ir reguliuoti komplemento komponentus (Chigo/Rodgers, Cromer, Knops sistemų antigenai), taip pat yra citokinų receptoriai ar adhezijos molekulės (Duffy, Lutheran, LW sistemų antigenai), bei gali turėti fermentų aktyvumą (Kell, Cartwright sistemų antigenai) [68].

2. Reikšmė kraujo transfuzijoms [37]:

- a) ūmios potransfuzinės reakcijos: ūmi hemolizinė potransfuzinė reakcija, anafilaksinė reakcija, potransfuzinė trombocitopeninė purpura, ūmi plaučių edema;
- b) lėto tipo potransfuzinės reakcijos: temperatūrinės reakcijos, Ta – GvHD reakcija, alerginės reakcijos.

3. Reikšmė organų transplantacijoms.

4. Reikšmė naujagimių hemolizinės ligos išsivystymui.

5. Kraujo grupių ryšys su kitomis ligomis.

Tam, kad tam tikra kraujo grupių sistema būtų pripažinta, reikia, kad toje kraujo grupių sistemoje dalyvaujantys genai būtų atskirti nuo kitų kraujo grupių sistemų genų. Taip pat kiekvienas iš jų turi būti polimorfiškas (t.y. turi turėti du ar daugiau alelių ir kiekvieną iš jų su tam tikru, pastebimu dažniu populiacijoje) arba turi būti žinoma chromosomos lokalizacijos vieta. Antigenai, kurie neatitinka šių kriterijų, kad būtų priskirti specifinei kraujo grupių sistemai, yra atidedami į tam tikrus „rinkinius“, kurie pirmiausia yra paremti biocheminėmis savybėmis ar fenotipiniais ryšiais, o taip pat grupuojami į eiles po aštuonis aukštesnio ar žemesnio dažnio antigenus [21].

Šiuo metu eritrocitų membranose serologiškai nustatyta daugiau negu 700 antigenų, iš kurių nemaža dalis suformuoja sistemas. Pagal tarptautinės organizacijos kraujo perpylimo klausimais nomenklatūrą (*International Society for Blood Transfusion* (ISBT) *Working Party* dabar skiriamos 29 genetiškai nepriklausomos kraujo grupių sistemos, kuriose funkcionuoja 269 įvairūs paveldimi eritrocitų antigenai (1 lentelė) [11, 65, 44, 67].

1 lentelė. Eritrocitų kraujo grupių sistemos, pasiūlytos ISBT [17, 44, 67].

Sistemos numeris pagal ISTB	Sutartinis sistemos pavadinimas	Sutartinis sistemos simbolis	Sistemos simbolis pagal ISTB	Antigenų skaičius	Lokalizacija chromosomoje	Antigeno molekulių funkcijos
001	ABO	ABO	ABO	4	q34.2	Šlapalo pernešimas
002	MNS	MN	MNS	44	4q31.21	Anijonų kanalo baltyminiai palydovai
003	P	P	P1	3	22q11.2–qter	Glikoziltransferazė
004	Rh	Rh	RH	56	1p36.11	Struktūriniai baltymai, transportinė funkcija (manoma šlapalo pernešimas)
005	Lutheran	Lu	LU	21	19q13.32	Adhezijos receptoriai laminimui

006	Kell	K	KEL	30	7q34	Metaloproteinazė (Zn-surišanti endopeptidazė) (Zn-neutrali)
007	Lewis	Le	LE	6	19p13.3	alfa(1,3) fukoziltransferazė
008	Duffy	Fy	FY	6	1q23.2	Receptoriai: chemokinių, Pl. Vivax
009	Kidd	Jk	JK	3	18q12.3	Šlapalo pernešimas
010	Diego	Di	DI	21	17q21.31	Anijonų pernešimas
011	YT (Cartwright)	Yt	YT	2	7q22.1	Acetilcholinesterazė
012	Xg (Sex – linked)	Xg	XG	2	Xp22.33	Manoma adhezijos receptoriai
013	Scianna	Sc	SC	7	1p34.2	Nežinoma
014	Dombrock	Do	DO	5	12p12.3	ADP- riboziltransferazė
015	Colton	Co	CO	3	7p14.3	Vandens pernešimas
016	Landsteiner-Wiener	LW	LW	7	19p13.2	Adhezijos receptoriai
017	Chido/Rogers	Ch/Rg	CH/RG	7	6p21.3	C4 komplemento sistemos komponentas
018	Hh	H	H	1	19q13.33	Alfa (1,2) fukoziltransferazė
019	Kx	Kx	XK	1	Xp21.1	Manoma neurotransmiterių transportas
020	Gerbich	Ge	GE	9	2q14.3	Membranos-citoskeleto vientisumo palaikymas
021	Cromer	Cromer	CROM	14	1q32.2	Komplemento sistemą reguliuojantys baltymai: imuninių kompleksų pašalinimą greitinantys faktoriai
022	Knops	Kn	KN	8	1q32.2	Komplemento sistemą reguliuojantys baltymai: CR1 receptoriaus funkcija

023	Indian	In	IN	2	11p13	Adhezijos receptoriai
024	Ok	Ok	OK	1	19p13.3	Manoma adhezijos molekulės
025	Raph	Raph	RAPH	1	11p15.5	Nežinoma
026	John Milton Hagen	JMH	JMH	1	15q24.1	Manoma adhezijos receptoriai
027	I	I	I	1	6p24.2	Šlapalo pernešimas
028	Globoside	Glob	GLOB	1	3q26.1	Manoma yra receptoriaus Parvo-B19 virusui ir E. coli [19]
029	Gill	Gill	GILL	1	9p13.3	Vandens pernešimas

2.2.2. Kraujo grupių antikūnai

Norint užtikrinti saugią transfuziją būtina nustatyti antikūnus, atsirandančius prieš kliniškai svarbius kraujo grupių antigenus, kurie gali sukelti potransfuzines reakcijas (2 lentelė) [2].

2 lentelė. Antikūnų nustatymo dažnis pacientui prieš transfuziją [13].

ANTI-KŪNAS	DAŽNIS
Anti – D	0.27 %
Kiti Rh antikūnai (be anti – D)	0.22 %
Anti – K	0.19 %
Anti - Fy (a) (Duffy a)	0.05 %
Anti – Jk (a) (Kidd a)	0.035 %

Antikūnai (Ak) arba imunoglobulinai (Ig) – specifinės organizmo imuninės sistemos baltyminės kilmės medžiagos, kurios susidaro organizme į jį patekus svetimų medžiagų (mikroorganizmų, svetimų baltymų). Antikūnus sintetina organizmas,

reaguodamas į eritrocitų membranose esančių antigenų (kurių jis paprastai neturi) poveikį [1, 46].

Imunoglobulinai - tai glikoproteinai, kurių sudėtyje yra nuo 2 iki 14% angliavandenių. Ig sudaro apie 20% plazmos baltymų. Jų taip pat yra ir ekstravaskuliniame skystyje, gleivinių sekretuose, kai kurių limfocitų membranose. Ig sintetina ir sekretuoja plazminės ląstelės, kurios išsivysto iš B limfocitų, šiems proliferuojant ir diferencijuojantis po stimuliacijos Ag [24].

2.2.2.1. Antikūnų struktūra

Imunoglobulinų molekulės pagrindinis struktūrinis vienetas yra „Y“ formos monomeras, kuris nepriklausomai nuo molekulinio svorio ir erdvinės struktūros yra sudarytas iš dviejų porų identiškų polipeptidinių grandinių:

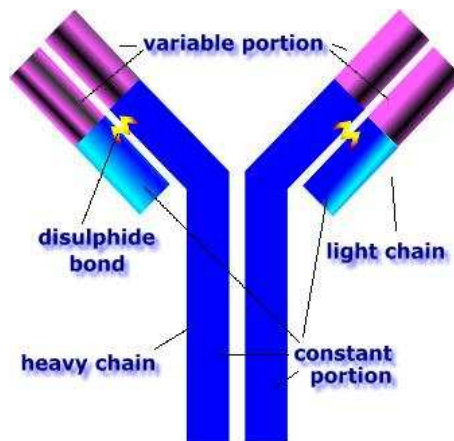
- dviejų sunkiųjų grandinių – **H** (angl. *heavy chain*, kurią sudaro apie 440 ± 120 amino rūgščių);
- dviejų lengvųjų grandinių – **L** (angl. *light chain*, kurią sudaro apie 220 amino rūgščių).

Šios keturios grandinės laikomos vienoje molekulyje nekovalentinėmis ir disulfidinėmis (-S-S-) jungtimis [1, 51, 47]. Imunoglobulinų molekulyje kiekviena polipeptidinė grandinė turi **kintamąjį** regioną (**V**) (angl. *variable*) ir **pastovųjį** (**C**) (angl. *constant*). Polipeptidinės grandinės erdvėje suformuoja erdvines struktūras – domenų, kurių kiekvienas apribojamas -S-S- jungtimi [1, 51, 47].

Lengvoji grandinė sudaryta iš dviejų domenų: V_L (kintamojo regiono domenų) ir C_L (pastovaus regiono domenų). Sunkiojoje grandinėje taip pat yra kintamojo regiono domenų- V_H , o domenų skaičius pastoviojoje grandinėje priklauso nuo Ig klasės: jų būna 3 arba 4. V_L ir V_H domenų hipervariabilios sritys suformuoja paratopus – antikūnų aktyviuosius centrus, kurie jungiasi su antigeninėmis determinantėmis (epitopais).

Proteolizinių fermentų (pvz.: papaino) poveikyje Ig molekulė suskaldoma į tris fragmentus:

- 1) du **Fab** fragmentus (angl. *fragment antigen binding*) turinčius antikūnų aktyvų centrą (V_H ir V_L domenuose), kuriuo atpažįsta antigeną eritrocitų membranoje ir prisijungia prie jo (1 paveikslas) [1, 46, 47];
- 2) **Fc** fragmentą (angl. *fragment crystallizable*) (1 paveikslas). Šį fragmentą sudaro likusieji H grandinės pastovios dalies domenai (C_H2 , C_H3). Jis nereaguoja su antigenu, tačiau atlieka kitas svarbias funkcijas [1]:
 - fiksuoja ir aktyvina komplementą (t.y. nuo Fc srities priklauso ir hemolizės tikimybė po kraujo transfuzijų);
 - vykdo transmembraninį transportą (pavyzdžiui anti-Rh antikūnų transportą per placentą vaisiui);
 - prijungia antigeno – antikūno imuninį kompleksą prie Fc fragmento receptorių (FcR) fagocitų (t.y. makrofagų) membranose, sukeldamas to komplekso fagocitozę, taip pat ir eritrocitų lizę [46].



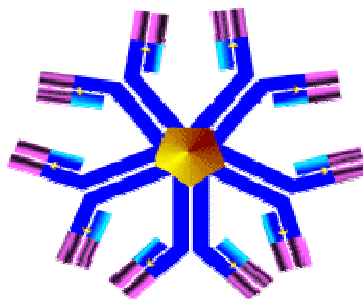
1 paveikslas. Imunoglobulinų struktūros schema [35].

2.2.2.2. Svarbiausios kraujo grupių imunoglobulinų klasės

Vienas ir tas pats antigenas gali indukuoti IgM, IgG ar IgA izotipų sintezę. Įvairių klasių antikūnai funkcionuoja skirtingose organizmo vietose, nevienodai realizuoja savo antrinį biologinį aktyvumą [47].

Imunohematologijoje svarbiausi IgG ir IgM, mažiau IgA klasių antikūnai. Kliniškai svarbūs yra tie antikūnai, kurie su eritrocitų antigenais jungiasi aukštesnėje nei 30°C temperatūroje ir geba aktyvinti komplemento sistemą [68].

IgM – tai yra pirmieji antikūnai, kurie sintetinami paveikus imunogenui [51]. Tai pentameras (2 paveikslas), kuris yra svarbus pirminio imuninio atsako formavimuisi ir kurio molekulinė masė yra 900 000 Da. IgM turi papildomą trumpą polipeptidinę grandinę, vadinama J grandine. Šie imunoglobulinai sudaro apie 10 % visų kraujo plazmoje esančių imunoglobulinų. Vidutinė koncentracija serume yra apie 1,1 g/l. Intravazaliai kraujyje ir limfoje yra 85 – 90% IgM kiekio. Tai „natūraliai“ atsirandantys, šaltieji antikūnai. Jų koncentracija ryškiai padidėja pirminio imuninio atsako metu ir ankstyvojoje imuninio atsako fazėje. IgM (monomerinė forma) su IgD yra subrendusių B limfocitų membranose. Antikūnai prieš eritrocitų A ir B antigenus – izohemagliutinai – yra IgM klasės. Nors jo molekulėje yra 10 aktyviųjų jungimosi sričių, tačiau dažniausiai jis funkciškai penkiavalentis. Šis Ig stipriai jungiasi prie eritrocitų antigenų ir sukelia ryškią agliutinaciją. Dėl didelės molekulinės masės jis nepraeina per placentą, tačiau IgM izotipo antikūnai stipriai ir efektyviai aktyvuoja komplemento sistemą, todėl jiems veikiant kyla didelė intravaskulinių hemolizių grėsmė [51, 52, 68, 47, 43, 48].



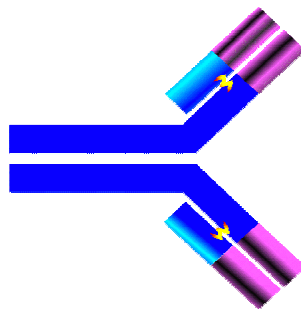
2 paveikslas. Žmogaus imunoglobulino M struktūra [35].

IgG – tai yra pagrindinis antikūnų tipas: svarbūs papildomam komplemento sistemos aktyvinimui, gali būti specifiskai surišamas makrofagų ir neutrofilų; vienintelis

iš antikūnų galintis pereiti per placentą. Imunizavus organizmą šiais imunoglobulinais jie atsiranda vėliau negu IgM (maždaug nuo trečios savaitės). Tai monomerai, kurių molekulinė masė 150 000 Da. Vidutinė jo koncentracija serume apie 12 g/l, bet svyravimo ribos labai plačios. Jie sudaro apie 75% visų kraujo plazmoje esančių imunoglobulinų. IgG₁ sudaro 60 – 70% viso IgG kiekio, IgG₂ – 14 – 20%, IgG₃ - 4 – 8%, ir IgG₄ – 2 – 6%. Apie 48 – 50% visų IgG yra ne kraujo induose. Tai pagrindinis organizmo skysčių Ig ir vienintelis Ig, kuris praeina pro placentą. IgG – divalentis antikūnas (molekulėje du paratopai), tuo pačiu jis sukelia tirpių Ak precipitaciją, o korpuskulinių – agliutinaciją. Dauguma IgG antikūnų yra „šiltieji“ - su antigenu reaguoja tik 37°C temperatūroje (3 paveikslas) [1, 51, 68, 47, 43, 48].

Kliniškai jie yra svarbūs, nes:

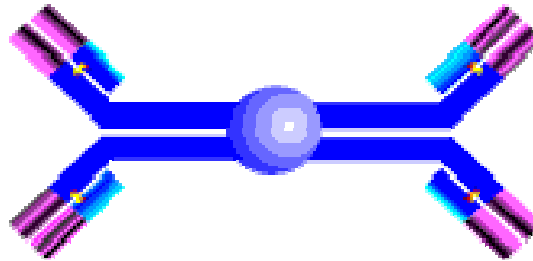
- dauguma autoantikūnų nustatomų autoimuninės hemolizės atvejais, yra IgG antikūnai (daugiausiai **IgG₁**, rečiau **IgG₃** poklasio). Šie gali jungtis prie C1q ir aktyvinti komplemento sistemą klasikiniu keliu [52, 68];
- jie geri opsoninai. IgG antikūnai (labiausiai IgG₃), susiformavus imuniniam kompleksui, pasižymi stipriu polinkiu jungtis prie makrofago FcR receptorių fagocituojančių ląstelių membranose, skatindami imuninių kompleksų fagocitozę, o kartu ir eritrocitų lizę;
- sąveikaudami su FcγR NK (natūralių kilių) ląstelių paviršiuje jie sukelia APLC reakciją, kurios pasekmė – taikinio (infekuotos ar mutavusios ląstelės) lizė [47].



3 paveikslas. Žmogaus IgG schema [35].

IgA organizme yra daug, tačiau kraujo plazmoje jis sudaro tik 10-15% visų imunoglobulinų. Dauguma serume esančių IgA yra monomerai (dažniausiai IgA₁

poklasio – 90%), tačiau gali sudaryti dimerus ir netgi multimerus, nes dalis IgA turi J grandinę. Šis imunoglobulinas sudaro pagrindinę antikūnų klasę sekrecijos skysčiuose: daugiausiai jo yra išskiriamų gleivinių paviršiaus, seilių ir ašarų liaukų, žarnyno, bronchų ir kituose dekretuose, kur jis dalyvauja organizmo apsaugoje nuo mikroorganizmų ir virusų. Molekulinė masė 180 000- 500 000 Da. IgA Fc fragmentas nereaguoja su komplemento baltymais, fagocituojančios ląstelės neturi jam receptorių. Dėl didelės molekulinės masės jis nepraeina per placentą, tačiau IgA multimerai gali aktyvinti komplemento sistemą klasikiniu keliu. IgA kartais padaugėja sergant autoimuninėmis ligomis (4 paveikslas) [51,70, 47, 43, 48].



4 paveikslas. Žmogaus IgA schema [35].

Antigenų ir antikūnų sąveikos nustatymo *in vitro* būdai

Antigenų ir antikūnų sąveika serologiškai nustatoma įvairiais būdais:

a) agliutinacijos reakcija. Agliutinacija (lot. *agglutinae* – prilipdyti) – tai korpuskulinių antigenų (Ag) sulipdymas su antikūnais (Ak) ir iškritimas į nuosėdas. Reakcija vyksta izotoniame (0,9 %) NaCl tirpale. Kraujo grupės rutininuose tyrimuose nustatomos pasitelkiant agliutinacijos reakcijas. Bet prieš tai reikia aptarti sąlygas, kurios būtinos antigenų ir antikūnų reakcijoms išryškinti. Įvairūs antikūnai su eritrocitų antigenais geriausiai reaguoja tam tikruose temperatūros intervaluose, esant tam tikram terpės rūgštingumui, šios reakcijos turi vykti tam tikrą laiką ir t.t;

b) precipitacijos reakcija;

c) hemolizės reakcija;

- d) adsorbcijos ir eliucijos;
- e) imunofluorescencijos;
- f) radioimuniniai (RIA – *radioimmunoassay*);
- g) imunofermentiniai (ELISA – *enzyme – linked immunosorbent assay*).

Veiksniai, būtini antigenų ir antikūnų sąveikai išryškinti *in vitro* nustatant kraujo grupes:

a) temperatūra. Labai svarbu žinoti, kokioje temperatūroje antikūnai (šaltieji ir šiltieji) labiausiai aktyvūs;

b) pH – paprastai rutininiuose tyrimuose naudojama neutrali terpė – pH 7,0;

c) inkubacijos laikas, kuris labai dažnai susijęs su temperatūra. Jei reakcija vyks per trumpai, agliutinacija gali dar nevykti. O jeigu reakcija vyks per ilgai, gali prasidėti susiformavusių agregatų disociacija (kadangi antigeno ir antikūno reakcija yra grįžtamojo pobūdžio). Taigi, reakcijai būtinas optimalus laikas;

d) antigenų ir antikūnų santykis (ekvivalentas) – jis būtinas pamatyti ryškia agliutinacijos reakciją. Paprastai eritrocitų naudojama dešimt kartų mažiau nei serumo. Tik esant prozone būklei (kai yra padidėjęs antikūnų santykis) arba sensibilizuotiems eritrocitams, ši taisyklė netinka;

e) reakcijos aplinkos joninė jėga – aplink eritrocitą, kuris yra įelektrintas neigiamai, gali susikaupti plazmoje esantys teigiamai įelektrinti baltymai, kurie trukdys antigeno ir antikūno reakcijai. Tokius baltymus reikia nuplauti specialiais tirpalais (arba 3 – 4 kartus izotoniniu tirpalu). Sumažindami tirpalo joninę jėgą, pageriname agliutinacijos reakcijos efektyvumą [68].

Rhezus kraujo grupių sistema

Rh kraujo grupių sistema

Rhezus kraujo grupių sistema yra antroji ir kliniškai viena svarbiausių bei sudėtingiausių kraujo grupių sistemų žmogaus kraujo transfuzijoje dėl savo didelio skaičiaus antigenų ir sukeliamų sunkių vaisiaus komplikacijų [30, 39]. Per paskutinįjį pusę amžiaus tiriant šią kraujo grupių sistemą buvo pažengta labai toli ir sužinota daug

daugiau apie procesus, už kuriuos būtent ir yra atsakingas Rh kraujo tipas. Tam, kas būtų galima suprasti Rh kraujo grupių sistemą, buvo atliekamas genų klonavimas, kuris funkcinio požiūriu įrodė, kas Rhexus kraujo grupės baltymai priklauso protėvinei membraninių baltymų šeimai, kuri aktyviai dalyvauja amoniako pernešime. Genų išsidėstymas ir forma Rh lokuse skatina genetinius mainus, sukuria naujus antigenus. Šiandien dieną jau yra nustatyti 52 Rh kraujo grupių sistemos antigenai raudonųjų kraujo ląstelių paviršiuje. Taip pat buvo nustatyta, kad šie antigenai yra kontroliuojami dviejų, labai artimai susijusių genų, esančių pirmojoje chromosomoje [39, 68].

Šiuo metu, tyrinėjant Rhexus kraujo grupių sistemą, taip pat labai svarbus yra ir Rh genetinis testavimas, kuris gali būti taikomas klinikinėms transfuzijoms medicinos ir nėštumo praktikoje. Tai apima RhD zigotiškumo testavimą, D antigeno būsenos suardymą ar sutvirtinimą, taip pat pakeistų RhD ir RhCE genų susekimą, kurie priklauso rizikos grupei tokiuose pacientuose (ypatingai tuose, kurie serga pjautuvo formos ląstelių liga), kurių organizmas galėtų gaminti antikūnus prieš plačiai paplitusius Rh antigenus. Rhexus baltymai formuoja pagrindinį kompleksą, kuris yra pavojingas eritrocitų membranų struktūroms. Rh šeimos baltymai apima neeritroidinius homologus, esančius daugelyje kitų audinių, o palyginamoji genomika atskleidžia šiuos Rh homologus visose gyvenimo srityse [39, 40].

Rhexus kraujo grupių sistema buvo pavadinta pagal tuo metu atliekamus eksperimentinius darbus su Rhexus genties beždžionėmis, kurių kraujas iš pradžių buvo naudojamas antiserumo gamybos tyrimams tam, kad būtų galima nustatyti kraujo tipą. Pavyzdžiui: jei antiserumas agliutino organizmo raudonąsias kraujo ląsteles, tai šis individas yra vadinamas Rh teigiamu; o jei taip neatsitinka, tai tiriamasis asmuo yra Rh neigiamas. Nepaisant Rh faktoriaus esamo genetinio sudėtingumo, Rh faktoriaus turėjimą ar jo nebuvimą galima numanyti iš ganėtinai abstraktaus ir paprasto modelio, kuriame vyrauja du aleliai, tai yra D ir d. Individai, kurie yra dominantinės homozigotos (DD) arba dominantinės heterozigotos (Dd) yra Rh teigiami. Tie asmenys, kurie yra recesyvinės homozigotos (dd) yra Rh neigiami (t.y. jie neturi Rh antigeno) [28, 34].

Rh nomenklatura

Įvairiose pasaulio šalyse yra naudojamas skirtingas Rexus kraujo grupių sistemos antigenų žymėjimas, kuris parodo genetines ar serologines šių antigenų savybes. Šiuo metu Rh sistemai paminėti yra prigijusios trys terminologinės formos, iš kurių pirmąją atrado du britų mokslininkai Drs. R. A. Fischeris ir R. Race'as, antrąją – Europoje paplitusią A. S. Wieneris, o trečiąją – labai paplitusią JAV, skaitmeninę nomenklatūrą, R. E. Rosenfieldas. Šios visos trys sistemos atspindi paveldimo kintamumo teorijas [28, 68].

Fischerio – Race'o sistema, kuri daug dažniau naudojama šiomis dienomis kasdieniniame laboratoriniame darbe, taip pat yra mažiau paini ir nurodanti esamus Rh grupės antigenus CDE panaudojant terminologiją. Ši sistema originali tuo, kad reikalauja, jog čia būtų trys artimai susiję genai kiekvienoje chromosomoje. Genai buvo pavadinti D genu ir jo hipotetiniu aleliu d, C genu ir jo aleliu c, bei E genu ir jo aleliu e. Kiekvienas genas, kaip ir buvo manoma, turi kontroliuoti atitinkamo antigeno produktą (pvz., D genas gamina D antigeną ir t.t.). Vis dėlto d genas pasirodė esantis tik nuspėjamas, bet nerealus (3 lentelė) [28].

A. S. Wienerio nomenklatūroje genai aprašomi viena raide: R reiškia, kad yra Rh₀ (t.y. D) genas, r – žymimi genai, kurie nekoduoja Rh₀, indeksu nurodant įvairius alelius (R¹, r¹ ir t.t.). Ši sistema naudoja Rh – Hr terminologiją. Ji plėtoja teoriją, kad čia buvo vienas genas vieninteliame lokuse kiekvienos chromosomos poroje ir kuris kontroliuoja sudėtinių antigenų gamybą. Ši idėja teigė, kad genas R duoda „raudonajam faktoriui“ Rh₀ (rh, hr), o genas r gamina rh ir hr (3 lentelė) [28, 68].

Šių trijų teorijų žymėjimas yra naudojamas kraujo banko operacijų sukeitimui (pvz., Rh₀ (D)). Wienerio užrašymas yra daug sudėtingesnis ir įmantresnis dažnam naudojimui. Dėl to lengviau paaiškinama ir plačiau yra naudojama Fischerio – Race'o teorija [28].

DNR testavimas parodė, kad abi šios teorijos iš dalies yra tikslingos. Čia yra du tarpusavyje susiję genai, iš kurių vienas – turintis sudėtinę specifiką, o kitas – vienareikšmės specifikos. Tokiu būdu Wieneris iškėlė prielaidą, kad genas gali turėti daugiareikšmę specifiką (kai kas nepatikėjo šiuo originalumu) ir tai buvo teisingai įrodyta. Iš kitos pusės Wienerio iškelta teorija, kad čia yra tik vienas genas, buvo įrodyta

neteisingai, tai pat kaip ir Fischerio – Race'o teorija, kuri teigė, jog čia yra trys genai [28].

3 lentelė. Rhexus sistemos antigenai [68].

Rh nomenklatūriniai variantai		
Rosenfieldo	Fisherio – Race'o CDE	Wienerio Rh – Hr
RH1	D	Rh ^o
RH2	C	rh ¹
RH3	E	rh ^o
RH4	C	hr ¹
RH5	E	hr ^o
RH6	ce (f) f	Hr
RH7	Ce	rh _i
RH8	C ^w	fh ^{w1}
RH9	C ^x	rh ^x
RH10	C (ce ^s) ce ^s	rh ^v hr ^v
RH11	E ^w	rh ^{w2} rh ₂ ^w
RH12	G	rh ^G
RH17		Hr _o
RH18		Hr (Hr ^s)
RH19		hr ^s
RH20	VS (ce ^s) e ^s , VS	Vs, e ^s

Rh sistemos antigenai

Rhezus kraujo grupių sistemos terminas apima kliniškai svarbiausius penkis pagrindinius Rh sistemos antigenus: C, c, D, E ir e. Šie penki antigenai dar yra vadinami Rh formule. Jie savo sudėtyje turi du integralinius, transmembraninius polipeptidus susidedančius iš 417 amino rūgščių ir kuriems yra būdinga jonų kanalų struktūra. Tikslios ir sudėtingos Rh sistemos genetinės savybės buvo nuolatos diskutuojamos nuo pat ankstyvųjų šios sistemos savybių atradimo. Rh kraujo grupių sistema iš tikrųjų yra daug sudėtingesnė nei buvo manoma anksčiau. Laikui bėgant, buvo nustatyta, kad čia yra du artimai susiję genai: RHD ir RHCE. Abu šie Rh genai sudaryti iš dešimties egzonų, kiekvienas iš jų turi keturis galimus alelius, kurie pateikia šešis antigenus iš kurių penki didžiausi yra ir tikrinami laboratorijose. Rh (D) genas yra dominantinis, atsakingas už D baltymo sintezę, o Rh (CE) genas – už CcEe baltymų sintezę. D baltymas nuo CE baltymo skiriasi maždaug 35 amino rūgštimis. Yra manoma, kad vis pasikartojančios rekombinacijos, nukleotidų pakeitimas, dideli nukleotidiniai tarpai (priklausomai nuo alu sekos) ir aukštas homologijos lygis tarp RHD ir RHCE genų, yra svarbūs šių genų formavimosi ir evoliucijos faktorius. Čia nėra d antigeno. Mažasis „d“ parodo D antigeno nebuvimą (RHD genas tuomet tiesiog yra pašalintas arba nefunkcionuojantis) [40, 28, 68].

Svarbiausias Rh antigenas yra RhD antigenas, nes jis yra labiausiai imunogeniškas iš visų penkių Rh antigenų. RhD antigeno imunogeniškumas priklauso nuo įvairiausių veiksnių:

1. **Antigeno dozės.** Vieno eritrocito membranoje apytikriai yra nuo 10000 iki 30000 RhD antigeno molekulių. Antigenų kiekis, taigi ir antigeniškumas bei imunogeniškumas priklauso nuo geno dozės (čia taip pat svarbu asmuo homozigota ar heterozigota) ir nuo Rh fenotipo [68, 23].

2. **D antigeno kategorijos.** Nustatyta, kad kai kurių RhD teigiamų asmenų kraujas, paveiktas anti – RhD turinčiu serumu, nerodo agliutinacijos reakcijos. Pasirodė, kad dėl tam tikrų D antigeno kokybinių ir kiekybinių savybių egzistuoja silpnesnės D antigeno formos. Šias silpnesnes D antigeno formas nustatant tik įprastais metodais (t.y. tik anti – D reagentais), donoro ir recipiento kraują galima įvertinti kaip RhD neigiamą.

D antigeno kategorijas lemia antigeno determinančių (epitopų) kiekis. D antigenas daugiausiai gali turėti apie 40 determinančių, bet kai kurie iš jų turi jų mažiau ar daugiau, todėl įvairuoja D antigeno stiprumas. Štai dvi silpnesnės D antigeno formos:

a) silpnas D antigenas, D^w (seniau vadintas D^u) – tai yra silpna reakcija su anti – D reagentu. Šiems, silpnesniems D antigenams nustatyti yra naudojami papildomi testai: pvz., nustatant konkretų D fenotipą.

Pasirodo, kad mažiau nei 1% atvejų ant eritrocitų ekspresuojama mažiau D antigenų (D^{weak}). Pagal D antigenų kiekio mažagal D antigenų kiekio mažėjimą anksčiau sutartinai D^{weak} buvo skirstomas į mažo ir didelio laipsnio. Kadangi D^w turi visus epitopus, tai asmenį, turintį tokį antigeną, nėra rizikos imunizuoti eritrocitais, kurie ekspresuoja normalų D antigeną. Todėl manoma, kad individus, turinčius D^{weak} nebūtina vadinti Rh neigiamais ir perpilti jiems Rh neigiamą kraują. D^{weak} fenotipą gali lemti įvairios genetinės priežastys [68]:

- susiformavęs mažesnis D antigeno molekulių skaičius ant eritrocitų. Taigi, asmuo yra RhD teigiamas, tik turintis mažesnę antigeno molekulių kiekį, kuris priklauso nuo fenotipo. Todėl skirtumas tarp D^w ir D fenotipų yra ne kokybinis, o kiekybinis;
- įgimtas silpnas D antigenas, kuris yra būdingas turintiems cDe, CDe, arba cDE haplotipus;
- transpozicijos – C genas iš vienos chromosomos slopina D geną iš kitos chromosomos (pvz., esant genotipui CDe/Cde). Dažniausiai dėl C geno transpozicijos sumažėja kokybiškai nepakitusio D antigeno ekspresija.

b) dalinis D antigenas arba D^{VI} – tai tokia kategorija, kai D antigeno , turinčio normalią antigeninę struktūrą, tam tikra determinančių dalis gali būti pasislėpusi gilesniuose eritrocitų membranos sluoksniuose. Tai yra silpnas D antigeno variantas. Tokį D antigeną dar vadina: parcialiniu D, D variantu, D kategorijomis ar mozaikiniu D antigenu, nes šiuo atveju ekspresuojamų antigenų kiekis gali būti didesnis arba mažesnis. Kadangi D^{VI} turi mažiausią D epitopų kiekį, todėl asmenis, turinčius tokį D antigeno variantą, galima lengviau imunizuoti RhD teigiamais eritrocitais, nei asmenis, turinčius kitus D antigeno variantus. Tačiau, palyginti su D neigiamaisiais asmenimis, asmenys turintieji D^{VI} antigeno kategoriją linkę mažiau imunizuotis. Rutiniškai D^{VI} kategorija nesiskiria nuo RhD teigiamos, kadangi turi pakankamą D antigenų kiekį. Pagal

tarptautinius susitarimus, recipientai turintys D^{VI} kategorija dar yra vadinami RhD neigiamais, o kaip kraujo donorai – RHD teigiamais, nors šio silpno D^{VI} antigeno imunogeniškumas yra mažesnis lyginant su įprastu D antigenu [68].

c) Rh nulinis fenotipas, Rh_{null} („ištrinti“ Rh kompleksai) – tam tikrose srityse gaminami neturintys aktyvumo Rh antigenai, esant neveikliam, funkciškai neaktyviam ar minimaliai aktyviam genui. Rh_{null} fenotipas yra padalintas į dvi dalis: į dažniausiai pasitaikantį Rh_{null} reguliatorinį geną ir antrąjį – supresorinį Rh_{null} geną, kuris kilo iš Rh lokuse esančio tyliojo geno homozigotiškumo. RhAG glikoproteinas yra laikomas kaip labiausiai kritinis Rh_{null} genas, priklausantis reguliatoriniam tipui ir kritiniam ekspresuojamam faktoriui esančiam Rh polipeptiduose, raudonosiose kraujo ląstelėse. Tyrinėjant autoantikūnus prieš raudonąsias kraujo ląsteles sergant autoimunine hemolizine anemija, buvo išsiaiškinta tai, kad mums gerai žinomi autoantigenų epitopai egzistuoja ant Rh polipeptidų [40, 68, 32, 26].

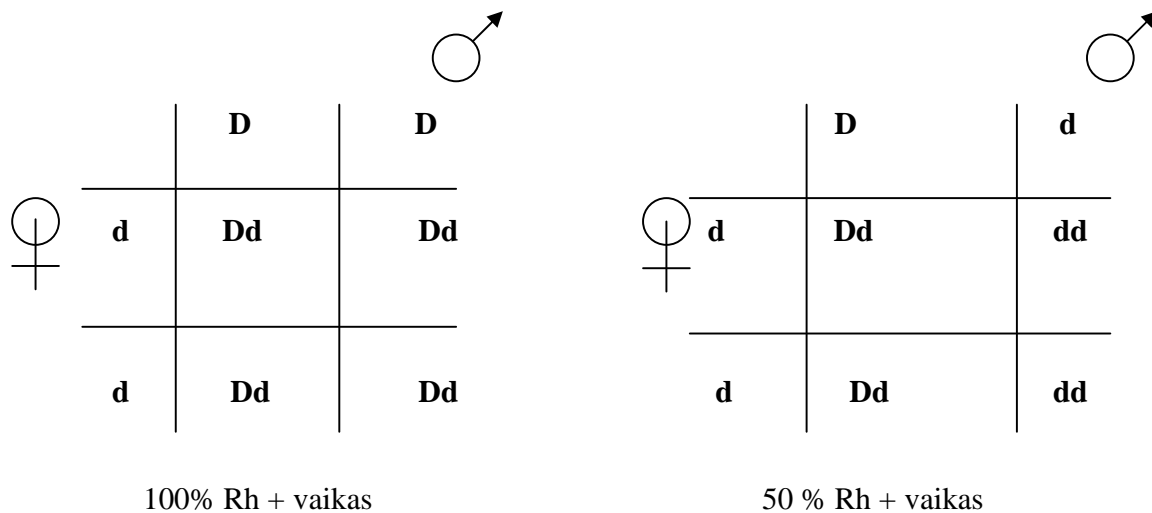
Daugiausiai (99%) klinikinių problemų sukelia jau minėti penki stipriausi Rh sistemos antigenai ir jiems specifiniai antikūnai, bet dėl antigeno didelio imunogeniškumo, kasdieniniame gyvenime, jei nėra būtina parinkti kraują perpylimui, pakanka tik nustatyti stipriausią Rh grupės antigeną D. Tačiau reikia nepamiršti, kad ir c antigenas yra labai imunogeniškas. Komplikacijos, kurias gali sukelti antikūnas anti – c, kartais panašios į anti – D antikūnų sukeltas komplikacijas [68].

Kas tai yra Rhexus faktorius?

Rh (D) molekulė – tai iš 417 amino rūgščių sudarytas eritrocitų transmembraninis baltymas (antigenas), kuris vingiuodamas 12 kartų kerta jų membraną. Ši molekulė sugeba stipriai paveikti intensyvias antigenines reakcijas. Tai yra antigeninė medžiaga, kuri stimuliuoja antikūnų gamybą kovojant su svetimais įsibrovėliais, tokiais kaip virusai, bakterijos ar persodinti organai. Kartu su A ir B antigenais RhD molekulė sudaro didžiulę schemą, kurią mes naudojame nustatant ar klasifikuojant žmogaus kraują dėl transfuzinio nesuderinamumo [40, 28].

Paviršinėse eritrocito membranos baltymo srityse yra Rh(D) antigeno aktyvūs centrai. Epitopų formavimasis Rh kraujo grupių sistemoje labai priklauso nuo eritrocitų membranoje esančios baltymo kilpos konfigūracijos ir erdvinės struktūros.

RhD antigenas yra genetiškai determinuotas, paveldimas autosominiu, dominantiniu būdu viename lokuse (pirmosios chromosomos trumpajame petyje, 1p36.13 – p34.3) su dviem aleliais, iš kurių Rh teigiamas – dominantinis, Rh neigiamas – recesyvus. Žinome, kad palikuonis vieną RhD geną paveldės iš motinos, kitą – iš tėvo, tačiau nepriklausomai nuo ABO kraujo grupės alelių. Lygiai taip, kaip ir ABO alelius, kiekvienas biologinis tėvas perduoda vieną iš dviejų savo Rh alelių savo vaikui. Jei tėvas yra dominantinė homozigota (DD) – tai visi jo vaikai paveldės šį geną, na o jei tėvas yra dominantinė heterozigota (Dd) – tai RhD teigiamą antigeną paveldės tik 50% jo vaikų (5 paveikslas). Motina, kuri yra Rh neigiama, gali perduoti tik Rh neigiamą alelį savo sūnui ar dukrai. Taigi, priklausomai nuo to, kokį Rh derinį paveldės, vaiko eritrocitai turės viengubą arba dvigubą Rh antigeno dozę. Tačiau, serologiškai ne visada reakcija bus tiesiog proporcinga Rh antigeno dozei [19, 68].



5 paveikslas. Motinos ir tėvo genotipai, bei galimi būsimų vaikų genotipai [19].

Individai turi arba neturi savo raudonųjų kraujo ląstelių paviršiuje Rh faktorių (arba Rh antigeną). Tai nulemia vieno geno buvimas arba nebuvimas. Tai gali būti

nurodomas su pliuso (+), arba su minuso (-) ženklu, kuris rašomas po nustatytos kraujo grupės (pvz., A -, arba B +). Tačiau, kad būtų tiksliau, laboratorijoje geriau yra naudoti ne šį žymėjimą dėl dažnai išskylančių klaidų ir neaiškumų. Dirbant laboratorijoje žymėjimas „RhD teig.“ yra naudojamas nusakyti RhD teigiamai kraujo grupių sistemai, o žymėjimas „RhD neig.“ – naudojamas RhD neigiamai kraujo sistemai nusakyti [28].

Tas individas, kuris yra RhD teigiamas, turi mažiausiai vieną RhD + alelį, bet gali turėti ir du RhD + alelius. Jų genotipas gali būti Rh +/Rh -. Tas asmuo, kuris turi Rh - faktorių, pasižymi Rh -/Rh - genotipu (4 lentelė) [22].

4 lentelė. Galimi Rhesus genotipai [22].

Rhesus faktorius	Galimi genotipai
Rh ⁺	Rh ⁺ /Rh ⁺ Rh ⁺ /Rh ⁻
Rh ⁻	Rh ⁻ /Rh ⁻

RhD neigiamiems individams yra bendra tai, kad jie neturi jokio anti – RhD IgG ar IgM, nes anti – RhD antikūnai nėra paprastai gaminami didėjant jautrumui prieš aplinkos dirgiklius. Tačiau RhD neigiami asmenys gali gaminti IgG anti – RhD antikūnus, atsižvelgiant į įjautrinimo atvejus: pvz., atsitiktinė kraujo transfuzija Rh teigiamu krauju [30].

RhD teigiami asmenys turi du genus: D ir CE, o RhD neigiami – tik CE geną, todėl jų eritrocitų membranose visiškai nepasigamina D antigeno. Tačiau dabar manoma, kad tokia D antigeno sintezės kontrolė būdinga tik baltosios rasės asmenims. Pastebėta, kad eritrocitai, turintys D antigeną, dažniausiai kartu gali turėti ir C bei E antigenus. Antigenai c ir e būna ir ant D teigiamų ir ant D neigiamų eritrocitų, bet dažniausiai D neigiami asmenys turi antigenus C – c + E – e +.

Įprastinėmis sąlygomis Rh faktoriaus turėjimas ar jo neturėjimas nėra susijęs su geresnėmis gyvenimo sąlygomis, taip pat neturi didelės reikšmės žmogaus gyvybei ir sveikatai. Tai yra svarbu tik tada kai du kraujo tipai (neigiamas ir teigiamas) susimaišo Rh neigiamajame žmoguje. Tuomet iškyla sunkumų ir problemų, nes Rh faktorius

pradedą veikti kaip antigenas tokio žmogaus organizme ir sukelia nepageidaujamą antikūnų gamybą. Be to, Rh faktorius žmogaus raudonosiose kraujo ląstelėse pasižymi dideliu skaičiumi papildomos antigeninės medžiagos, kuri gali būti klasifikuojama į daugelį kraujo grupių sistemų. Tačiau būtent Rh kraujo grupių sistema yra vienintelė, atskirta nuo ABO kraujo grupių sistemos, o tai yra labai svarbu atliekant kraujo perpylimus. Jei Rh teigiamas kraujas yra perpilamas Rh neigiamam asmeniui, tai vėliau palaipsniui jo organizme ima vystytis antikūnai, vadinami anti – Rh agliutininais, kurie prisijungia prie raudonųjų kraujo ląstelių, ima veikti šias, sukeldami raudonųjų kraujo ląstelių agliutinaciją. Ilgainiui to rezultatas yra ląstelių suardymas (hemolizė). Jei Rh neigiamam recipientui dar papildomai antrą, ar net ir trečią kartą yra atliekama Rh teigiamo kraujo transfuzija, tai anti – Rh agliutininų koncentracija tampa pavojingai didelė ir sukelia sunkią ar net mirtiną reakciją. Tokio pat tipo imuninės reakcijos įvyksta Rh neigiamos motinos kraujyje kuri yra nėščia ir savo iščiose nešioja Rh teigiamą vaisių (galimybė įvykti šiai situacijai yra didelė, jei būsimojo kūdikio tėvas yra Rh teigiamas, taip pat tai priklauso ir nuo kūdikio tėvo Rh faktoriaus stiprumo). Dalis kūdikio kraujo gali pereiti į motinos cirkuliaciją ir tai gali būti agliutininų prieš vaisiaus raudonąsias kraujo ląsteles formavimosi priežastimi [32].

Poligeninis D antígeno paveldėjimas

Skirtingai nei ABO kraujo grupių sistemos tipe, kur visi aleliai yra išdėstyti devintosios chromosomos vieno fokuso poroje, Rhexus faktorius apima tris skirtingas alelių poras (C ir c, D ir d, E ir e) išdėstytas trijuose skirtinguose pirmosios chromosomos poros fokusuose. Galimi genotipai gali turėti vieną C ar c, vieną D ar d ir vieną E ar e alelius iš kiekvienos chromosomos. Pvz., CDE/cde, cde/cde, CdE/cDe, CDe/CdE ir t.t. Tam, kad būtų įmanoma nustatyti kiek yra galimų skirtingų genotipų, pirma reikia nustatyti kiek yra galimų gametų kiekvienam tėvui. Tuomet, visas galimas gametas reikia surašyti į genetinę lentelę. Net jei trys genų poros yra susijungusios į vienos chromosomos homologinę porą, čia yra iš viso aštuonios galimos skirtingos gametos kiekvienam tėvui: CDE, CDe, CdE, Cde, cDE, cDe, cdE ir cde. Šis esamų gametų skaičius yra pagrįstas tuo, kad visais galimais atvejais, šie genai gali būti paveldimi

kiekvienos pirmosios chromosomos homologinėje poroje (tai nėra pagrįsta atsitiktiniu, šių genu pasirinkimu tėvuose mejozės metu, nes visi šie trys genai kartu yra labai glaudžiai vienas su kitu susiję toje pačioje chromosomoje; todėl šie trys genai linkę būti kartu tose pačiose dviejose gametose: CDE ir cde) [42].

Antikūnų, prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus, tipai

Pagal kilmę antikūnai prieš eritrocitų antigenus gali būti:

- Įgimti arba natūralūs, pvz., anti – E;
- Įgyti antikūnai, pvz., anti- D, anti- C.

Pagal antigenus, kurie sukėlė šių antikūnų gamybą :

- **aloantikūnai** (dar vadinami izoantikūnais) – rūšiai specifiniai, būdingi skirtingiems, vienos rūšies individams. Tai yra tokie antikūnai, kurie pasigamina, kai organizmą veikia svetimi jam tos pačios rūšies individo kraujo grupių antigenai, pavyzdžiui, esant Rhesus konfliktui nėštumo metu. Tai imuniniai aloantikūnai. „Natūralūs“ aloantikūnai atsiranda veikiant mikroorganizmams, turintiems panašius į kraujo grupių antigenus, su kuriais žmogus susiduria, pavyzdžiui, esant žarnyno bakterinei kolonizacijai [4, 16, 52, 68];
- **autoantikūnai** – tai antikūnai nukreipti prieš savo organizmo eritrocitų antigenus, nesusiję su hemotransfuzijomis. Jų atsiradimą lemia biologiniai, fizikiniai ir cheminiai veiksniai (vaistai). Pakitę savi antigenai tampa imunogenais ir prasideda antikūnų prieš juos gamybą. Dažniausiai jų atsiradimo priežastis lieka neaiški. Kiek rečiau, autoantikūnai gali atsirasti kaip pagrindinės, paprastai sunkios ligos komplikacija. Atsiradę autoantikūnai dažniausiai yra šilumos, IgG klasės. Autoantikūnai turi panašų specifiškumą antigenams, kaip ir aloantikūnai [4, 16, 52, 68].

Pagal antigenų ir antikūnų sąveikos nustatymo būdą (serologinį aktyvumą) :

- **agliutinuojantys** antikūnai arba agliutininiai, kurie po sąveikos su atitinkamais eritrocitų antigenais gali sukelti matomą eritrocitų agliutinaciją NaCl tirpale, kuriame eritrocitai yra įelektrinti neigiamai ir jie stumia vienas kitą. Todėl agliutinaciją lengviau sukelia didesnės IgM molekulės, kurios sugeba suformuoti tiltelius (jungtis) tarp šių eritrocitų. Kadangi IgM kraujo grupių antikūnai dažniausiai yra aktyvūs žemesnėje temperatūroje, todėl agliutinacijos testai atliekami kambario temperatūroje. Ir todėl tokie antikūnai dar vadinami pilnaisiais. Eritrocitų membranos neigiamą krūvį daugiausiai lemia glikoproteinai ir glikolipidai, kurie ir yra eritrocitų antigenai. Kai IgG klasės antikūnų titras yra didelis, agliutinacijos reakcija taip pat įmanoma [47, 68].

- **neagliutinuojantys** (koagliutininiai) ir blokuojantys (nepilnieji) antikūnai. Antikūnai, serologiškai vadinami nepilnaisiais, imunologiškai yra įprasti ir visiškai aktyvūs. Jie taip pat jungiasi su eritrocitų antigenais NaCl terpėje, tačiau patys nesugeba suformuoti stabilių agliutinatų dėl nedidelio molekulės dydžio, koncentracijos, silpnosio polinkio jungtis prie antigeno. Nepilnieji antikūnai paprastai yra šiltieji ir priklauso IgG klasei. Šie antikūnai gali blokuoti vienu metu ar vėliau pradėtų agliutininų (kurie turi panašias savybes) reakcijas su antigenais. Nepilniesiems antikūnams nustatyti reikia tam tikros papildomos terpės, kuri galėtų:

- a) arba mažinti neigiamą eritrocitų paviršiaus krūvį (dekstrasas, albuminai);

- b) arba vandeniniuose tirpaluose mažinti eritrocitų paviršiaus įtempimą (albuminai, proteazės);

- c) arba padidinti antikūnų polinkį (afinitetą) jungtis prie eritrocitų antigenų (mažos joninės jėgos tirpalai – LISS);

- b) arba pagerinti sąlygas antikūnams pasiekti antigenus (proteazės).

Tačiau ir IgM antikūnus, kai jų titras nedidelis ar jie pasižymi mažu avidiškumu, galima nustatyti naudojant papildomų terpių ar agliutinacijos testus [47, 68].

- **aktyvinantys komplementą** antikūnai. Kai kurie kraujo grupių antikūnai gali aktyvinti komplemento kaskadą:

a) iš dalies – iki C3b;

b) visiškai – iki C5b – C9 (vadinamieji hemolizinais).

Ar komplementas aktyvinamas, paprastai nustatoma antiglobulininiais ir (arba) hemolizininiais testais (kai visiškai aktyvinamas komplementas) [47, 68].

- **antikūnai, nustatomi naudojant fermentus.** Daugiau nei 70% kraujo grupių antikūnų yra nustatomi naudojant fermentus, mat apdorojant tokius eritrocitus fermentais (pvz., proteolizininiais), sumažėja sialo rūgšties kiekis eritrocitų membranose, todėl sumažėja eritrocitų neigiamasis krūvis ir jie gali priartėti vienas prie kito. Todėl net ir mažesnės IgG antikūnų molekulės gali sujungti du eritrocitus ir juos fiksuoti Fab fragmentais. Tuomet antigenų ir antikūnų reakcija tampa gerai matoma [47, 68].

- **Kumbso antikūnai.**

Dar 1945 metais R. Coombsas, A. Mourantas ir R. Race'as aprašė testą, kuriuo nustatomi neagliutinuojantys anti- Rh antikūnai serume [33]. Vėliau šis testas buvo pritaikytas nustatant antikūnų ir komplemento komponentų, kurie *in vivo* gali padengti eritrocitus [2, 60]. Šiame teste yra naudojami antikūnai prieš žmogaus imunoglobulinus, todėl jis ir dabar vadinamas antiglobulininiu testu arba Kumbso (Coombs) reakcija.

Kumbso reakcija padeda nustatyti vienvalenčius arba nepilnuosius (t.y. nesukeliančius eritrocitų agliutinacijos), blokuojančius antikūnus, kurie yra padengę tiriamuosius eritrocitus arba kurie laisvai cirkuliuoja kraujyje. Šie antikūnai susidaro esant patologinei būklei, Rh neatitikimui, vykstant autoimuniniam procesui, pasireiškus virusinei, riketsinei, bakterinei infekcijai. Nepilnieji antikūnai gali jungtis su antigenu, tačiau dėl mažo IgG molekulės dydžio ar nedidelio jų kiekio, taip pat dėl afiniteto ar mažo antigenų tankio eritrocitų membranoje, jie nesugeba sudaryti stabilių jungčių tarp eritrocitų. Todėl *in vitro* nesukelia agliutinacijos, precipitacijos ar kitokių fenomenų [51]. Agliutinacijos reakcijai išryškinti ir naudojamas Kumbso reagentas.

Kumbso reagentas – tai yra antikūnai prieš IgG Fc fragmentą (jei antiimunoglobulininis reagentas yra monospecifinis). Tačiau rutininuose tyrimuose dažniau naudojami polispecifiniai antiimunoglobulininiai reagentai, turintys antikūnų ne tik prieš IgG, bet ir prieš IgM, IgA, komplemento komponentus: C3b, C3d, C3c.

Imunohematologijoje yra naudojami du Kumbso reakcijos tipai:

a) tiesioginė (tiesioginis antiglobulininis testas (angl. *direct antiglobulin test*, DAT) [60, 68, 70]. Tiesioginė Kumbso reakcija (tiesioginis antiglobulininis testas) atliekama, kai yra pagrindo manyti, kad nepilnieji antikūnai ar komplemento komponentai (C3d, C4d) tiriamojo individo organizme yra susijungę su eritrocitais [14, 33, 60]. Prieš atliekant Kumbso reakciją, tiriamieji eritrocitai, jei yra įtariama, kad jie gali būti sensibilizuoti ieškomais antikūnais, kruopščiai nuplaunami 0,9% NaCl tirpalu. Naudojant šią procedūrą siekiama, kad nuo eritrocitų būtų nuplauti kraujo serume esantys baltymai (kurie gali trukdyti reakcijai), o liktų tik eritrocitus padengę antikūnai.

Kumbso reagentas – antikūnai prieš IgG Fc fragmentą (jei šis yra monospecifinis). Kumbso reagente esantis anti – IgG Fab fragmentais sujungia dviejų nepilnų antikūnų (prisijungusių prie skirtingų eritrocitų) molekulių Fc fragmentus ir todėl įvyksta agliutinacija.

Tačiau rutiniuose tyrimuose gali būti naudojamas polispecifinis antiimunoglobulininis reagentas, t.y. serumas, turintis antikūnų ne tik prieš žmogaus IgG (bet ir prieš IgM ir IgA), tačiau ir antikūnų prieš komplemento komponentus, ypač C3d ar C4d.

Teigiama reakcija (t.y. agliutinacija įvyko) rodo, kad paciento eritrocitai yra sensibilizuoti, t.y. padengti IgG antikūnais.

Neigiamas tiesioginės Kumbso reakcijos rezultatas (t.y. agliutinacija neįvyko) rodo, kad tiriamieji eritrocitai organizme nebuvo sensibilizuoti, t.y. tiriamieji eritrocitai nebuvo padengti antikūnais.

Šis, tiesioginis Kumbso antiglobulininis testas gali būti naudingas nustatant:

- naujagimių hemolizinę anemiją;
- autoimuninę hemolizinę ligą;
- vaistų sukeltą imuninę hemolizę;
- ūmias ar lėto tipo hemolizines potransfuzines reakcijas (perpylus netapataus kraujo, gali susidaryti nepilnų antikūnų);
- antikūnų vertinimo;

b) netiesioginė (netiesioginis antiglobulininis testas (angl. *indirect antiglobulin test*, IAT)). Netiesioginė Kumbso reakcija (netiesioginis antiglobulininis testas) irgi

padeda nustatyti nepilnus antikūnus, tačiau nefiksuotus, o laisvai cirkuliuojančius kraujyje ir kituose organizmo skysčiuose [33, 46, 51, 68]. Šie antikūnai, taip pat kai kurie komplemento komponentai gali specifiškai reaguoti su eritrocitais *in vivo* [14, 54, 60].

Tiriamasis serumas, kuriame manoma esant nepilnųjų antikūnų, sumaišomas su žinomos kilmės antigenais (pvz., Rh (D)+ eritrocitais) ir Kumbso reagentu (dažniausiai polispecifiniu arba monospecifiniu, turinčiu anti- IgG). Dar geriau yra panaudoti net kelių donorų žinomus eritrocitus, kuriems nustatyta kiek įmanoma daugiau antigenų.

Teigiamos netiesioginės Kumbso reakcijos rezultatas – agliutinacijos reakcija – serume yra nepilnųjų antikūnų prieš eritrocitų antigenus ar komplemento komponentus.

Netiesioginis antiglobulininis testas padeda nustatyti antikūnus kraujo serume ir gali būti naudojamas:

• nustatyti nėščiujų kraujo serume esančius nepilnuosius antikūnus ir numatyti Rh konfliktą;

- parinkti kraują perpylimui;

- nustatyti kai kuriems antigenams, taip pat rečiau pasitaikantiems ar silpniems antigenų variantams.

- Antiglobulininio testo atlikimas, panaudojant gelio metodiką.

Antikūnų paieška ir identifikavimas buvo atliekami mikromėgintuvėliuose.

Dar 1986 metais Lapierre užpatentavo metodą, kuriame panaudojamos gelio dalelės. Atliekant testavimą gelio metodika, vietoje standartinių mėgintuvėlių naudojami šeši mikromėgintuvėliai patalpinti į plastikinę, taip vadinamą gelio kortelę [2, 8, 14].

Mikromėgintuvėlius užpildo buferinis dekstrino pagrindu pagamintas gelis, kuris gali būti:

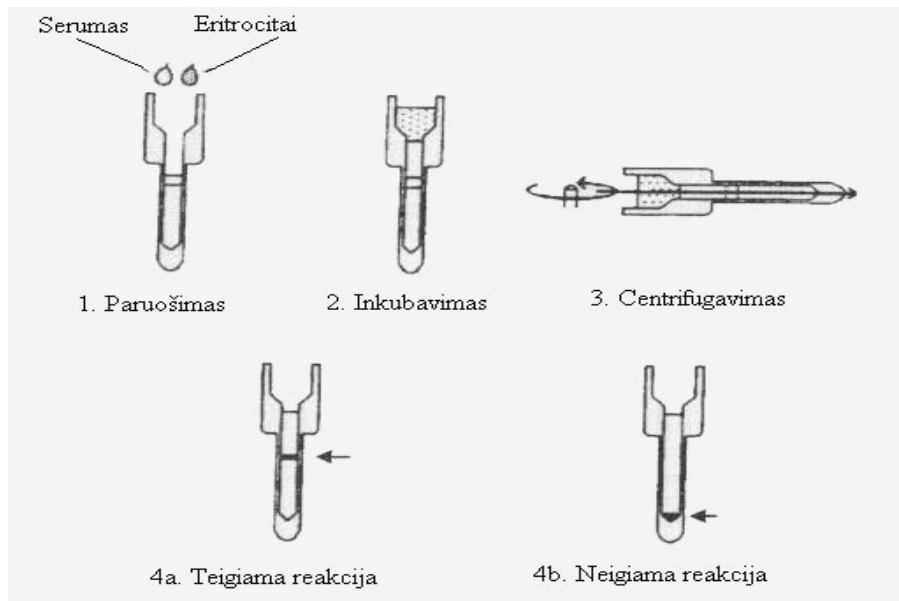
- neutralus (t.y. neturėti papildomų antikūnų),

- specifinis (turi monokloninius ar polikloninius antikūnus prieš kraujo grupių antigenus

- antiglobulininis (polispecifinis ar monospecifinis), kuriame yra antikūnai prieš žmogaus imunoglobulinius ar komplemento komponentus [66].

Atliekant antiglobulininį testą, į mikromėgintuvėlius pridedama eritrocitų suspensijos ir tiriamojo serumo (jei netiesioginė Kumbso reakcija). Eritrocitų reakcija

arba sensibilizacija vyksta inkubacijos metu mikromėgintuvėlio viršutinėje reakcijos kameroje, tokiu būdu išvengiama ŽAG neutralizacijos serumo proteinais. Centrifuguojant sensibilizuoti eritrocitai nusodinami per gelį į mikromėgintuvėlio apatinę dalį (6 paveikslas) [8, 14].



6 paveikslas. Antiglobulininio testo atlikimas, naudojant gelio metodiką [8].

Esant **teigiamai** reakcijai, eritrocitai, kontaktuodami reakcinėje kameroje su ŽAG, esančiu gelio matricoje, sudaro hemagliutinatų kompleksus. Šie imuniniai kompleksai, priklausomai nuo reakcijos stiprumo, išsidėsto arba gelio paviršiuje, arba įstringa gelio matricoje. Esant **neigiamai** reakcijai, neagliutinuoti eritrocitai laisvai praeina gelio matricą, sudarydami kompaktišką sluoksnį mikromėgintuvėlio dugne (7 paveikslas) [2, 8, 14].

Eritrocitų agliutinatų dydis priklauso nuo antigenų ir antikūnų savybių ir inkubacijos trukmės. Dideli agliutinatai nusėda virš gelio, o maži ir mažesni – įstringa gelio struktūroje. Gelio matricos struktūra yra tokia, kad veikiant svorio jėgoms, neagliutinuoti eritrocitai laisvai praeina per gelį, o agliutinuoti – nusėda virš gelio, arba įstringa jo matricos struktūroje.

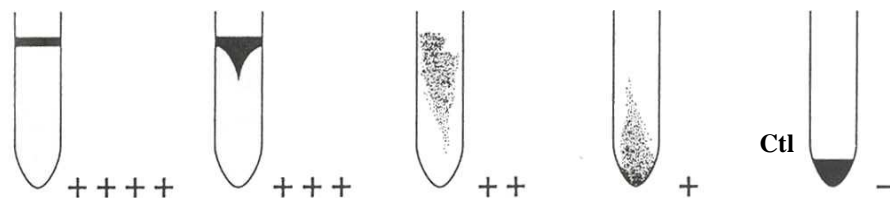
Tyrimų rezultatai gali būti vertinami vizualiai arba specialios kompiuterinės programos pagalba. Rezultatai vertinami taip (7 paveikslas):

Teigiama reakcija + + + + arba + + +. Agliutinuoti eritrocitai formuoja raudoną liniją gelio paviršiuje.

Silpnai teigiama reakcija + + ir + : Dalis agliutinuotų eritrocitų lokalizuojasi gelio paviršiuje, kiti disperguoja gelyje, sudarydami vertikalią raudonos spalvos juostą.

Neigiama. Eritrocitai, laisvai difundavę per gelio matricą, kompaktiškai nusėda mikromėgintuvėlio dugne.

Kontroliniame mėgintuvėlyje (ctl) reakcija turi būti neigiama [14].



7 paveikslas. Agliutinacijos reakcijos rezultatų vertinimas.

Pagal temperatūrą, prie kurios vyksta antigeno – antikūno imuninės reakcijos:

- **Šaltieji antikūnai** (ŠAA), vadinami pilnieji, su eritrocitų antigenais paprastai reaguoja žemesnėje temperatūroje (4 - 27°C) [4]. Jie dažnai yra natūralūs (natūraliai atsirandantys) IgM klasės antikūnai. *In vitro* ŠAA sukelia matomą agliutinaciją, nes sudaro stabilias jungtis tarp eritrocitų, kadangi vienas antikūno Fab fragmentas jungiasi su antigeno epitopu (veikliąja sritimi) vieno eritrocito paviršiuje, o antras Fab fragmentas jungiasi su analogišku epitopu, esančiu kito eritrocito paviršiuje [4, 68].
- **Šilumos antikūnai** (ŠIA), vadinami nepilnieji arba neagliutinuojantys, su eritrocitų antigenais paprastai reaguoja aukštesnioje temperatūroje (37 °C). Jie priklauso IgG₁ arba IgG₃ poklasiui. *In vitro* matomos agliutinacijos nesukelia. Apie 98% atvejų reaguoja su

autologiniais eritrocitų antigenais ir fiksuojasi ant eritrocitų paviršiaus. Kartais ŠIA yra nukreipti prieš specifinį eritrocitų antigeną [4, 9, 68].

ŠIA gali aktyvinti komplemento sistemą:

- iki C3b;
- iki C5b – C9 (MAK) [9, 54].

Antikūnai prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus

Tai yra imuniniai antikūnai, kurie prieš šios sistemos antigenus atsiranda po kraujo perpylimo ar nėštumo [56]. Šios sistemos antikūnai daugiausiai priklauso IgG tipui – IgG₁ ir/arba IgG₃ poklasiui ir dažniausiai yra šiltieji (su antigenu reaguoja 37⁰C). Tai nėra natūralūs antikūnai, tačiau jie gali susidaryti veikiant atitinkamam Rhesus sistemos antigenui. Dažnai šie antikūnai veikia kartu su kitais antikūnais taip sustiprindami savo biologinį aktyvumą. Anti - E ir anti - C^w antikūnai gali atsirasti natūraliai, be žinomos stimuliacijos. Antikūnai anti -E, anti - e ir anti - C^w gali būti ir IgM klasės [52]. Antikūnai prieš Rh sistemos antigenus sąveikaudami su antigenu retai aktyvina komplemento sistemą [52, 60]. Jų hemolizinio aktyvumo skirtumų negalima nustatyti įprastais serologiniais metodais. Tačiau perpilant eritrocitų masę, anti - Rh antikūnų būvimas vertinamas naudojant RhD + teigiamas ląsteles.

Aloantikūnai prieš šios kraujo grupių sistemos antigenus lengvai atsiranda žmonėms, kurių fenotipas yra – (Rh_{null}, D- -). Dauguma autoantikūnų – šiltieji, IgG klasės, yra specifiški Rh sistemos antigenams, ypač e antigenui [57, 17].

Visi antikūnai prieš Rh sistemos antigenus sukelia NHL. Hemolizė sukelta šių antikūnų vyksta ekstravaskuliariai [52, 57].

- RhD antigenas yra stipriausias imunogenas, todėl antikūnai prieš šį antigeną (**anti-D antikūnai**) yra labiausiai paplitę ir kliniškai ypač svarbūs. Jie dažniausiai atsiranda po hemotransfuzijų ir gali būti naujagimių hemolizinės ligos priežastimi. Tokiais atvejais anti - D antikūnai dažnai veikia kartu su anti-C (1/3 atveju) ar anti-E antikūnais (2% atveju).

- **Anti-E antikūnai** – antrieji pagal dažnumą anti – Rh antikūnai. Neaišku kodėl, bet kartais jie yra nustatomi ir kaip natūraliai susiformuojantys antikūnai. Tuomet jie yra šaltieji. Natūraliai susiformavusių antikūnų buvo nustatyta vyrų kraujyje, kuriems nebuvo perpilta kraujo. Šie, anti – E antikūnai gali sukelti NHL. Jų klinikinė reikšmė abejotina. Kliniškai svarbesni yra tie anti – E antikūnai, kurie veikia kartu su anti - c. Anti - c yra sunkiai identifikuojami esant kartu ir anti - E. Todėl įpylus E – c + kraujo, gali sukelti hemolizines potransfuzines reakcijas. Todėl, jei asmuo turi CCDee fenotipą, tai latentinei imunizacijai su c antigenu išvengti jam reikėtų parinkti to paties fenotipo kraują [60].

- **Anti-c** – po anti – D pagal klinikinę svarbą yra antrasis antikūnas. Anti – c - tai yra trečias pagal dažnumą antikūnas (po anti – D ir anti – A), sukeliantis naujagimių hemolizinę anemiją. Anti – c dažniausiai yra atsakingas už lėto tipo hemolizines potransfuzines reakcijas. Pastebėta, kad šie antikūnai po hemotransfuzijų atsiranda retai, nes c antigenas yra silpnas imunogenas, įvykus imunizacijai anti – c antikūnai gana greitai išnyksta. Jei recipientas jau turi anti – c antikūnų, tai jam yra problematiška parinkti donorą dėl gana dažno (80 %) c antigeno paplitimo. Tačiau šie antikūnai dažnai veikia kartu su anti-E antikūnais (ypač jei asmuo yra CCDee fenotipo) ir sukelia lėto tipo hemotransfuzines reakcijas ir NHL [51, 53, 60].

- **Anti-C** antikūnai po hemotransfuzijų atsiranda gan retai, nes C antigenas yra labai silpnas imunogenas. Anti-C antikūnai retai veikia vieni, dažnai kartu su anti-D arba anti-c antikūnais. Jei serume yra anti-C, tai dažniausiai yra randamas **anti-C^w**. RhD teigiamiems asmenims retai atsiranda anti-C. Jei asmuo, kurio fenotipas ccDEE kraujo serume turi šių antikūnų, tai reikia būti atsargiems, nes vienu metu gali įvykti imunizacija su e antigenu. Todėl tokiu atveju būtina parinkti identišką donoro fenotipą [6, 52].

- **Anti - e** antikūnai dažniau sutinkami kaip autoantikūnai. Šiltieji autoantikūnai silpnai reaguoja tik su E antigenus turinčiomis ląstelėmis, o ypač su EE fenotipo ląstelėmis. Anti – c antikūnus adsorbuoja EE fenotipo ląstelės. Kaip aloantikūnai pasitaiko retai, nes 98% populiacijos turi šį antigeną, bet būtent dėl didelio šio geno dažnumo anti – e antikūnai yra svarbūs. Tai šiltieji antikūnai. Anti-e aloantikūnai veikia kartu su anti-C. Jei asmuo

turi ccDEE fenotipą, tuomet reikia kreipti dėmesį į anti – C, anti – ce ir anti – Ce antikūnų titrą, parenkant tapatų donoro fenotipą imunizacijai išvengti [52].

- **Anti - C^w** antikūnai po hemotransfuzijų ir nėštumo atsiranda retai, nes C^w antigenų paplitimo dažnis populiacijoje yra 1 - 2%. Anti - C^w antikūnai yra specifiški tik C^w antigenui, su C antigenu nereaguoja. Anti - C^w antikūnai sukelia ūmią NHL ir hemolizines potransfuzines reakcijas [6, 7].

2.7. Aloantikūnų prieš Rhesus kraujo grupių sistemas antigenus atsiradimas po hemotransfuzijų

Aloantikūnų atsiradimas po hemotransfuzijų priklauso nuo:

- lyties (nėštumų skaičius);
- amžiaus;
- transfuzijų skaičiaus.

Nemažą reikšmę aloantikūnų susiformavimui turi ir kiti faktoriai: recipiento imuninės sistemos būklė, ligos, kai kuriais atvejais vartojami medikamentai (imunosupresantai) [13].

Po kraujo perpylimo, nėštumo arba po audinių transplantacijos į organizmą patenka eritrocitų membranoje esantys antigenai, kurie gali sukelti specifinių aloantikūnų prieš Rhesus kraujo grupių antigenus - gamybą. Ar recipiento imuninė sistema sureaguos į svetimą antigeną priklausys nuo įgimtų (genetinių) ir įgytų faktorių – antigeno dozės, veikimo trukmės ir imunogeniškumo. Tačiau tikslus veikimo mechanizmas iki šiol nežinomas [62, 64].

Imunogeniškumas yra apibūdinamas kaip tam tikro antigeno sugebėjimas organizme inicijuoti antikūnų gamybą. Pavyzdžiui, kaip jau minėjome D antigenas yra laikomas stipriausiu imunogenu. Recipientui neturinčiam šio antigeno, perpylus Rh D teigiamo kraujo, anti-D antikūnai pasigamins 80% atvejų. Woodrow ir Donahue apskaičiavo, kad įpylus tik 0,1 ml. Rh(D) + teigiamo kraujo, recipientui neturinčiam šio

antigeno, gali pasigaminti antikūnai anti - D. Tačiau ligoniams, kurių imuninė sistema yra nuslopinta, šis dažnis yra žymiai mažesnis [5, 55, 58, 63].

Kraujo grupių antigenų santykinis imunogeniškumas apskaičiuojamas pagal antikūnų paplitimo dažnį, jį lyginant su kitų antigenų, pavyzdžiui su K. Santykinė tikimybė susiformuoti antikūnams ne prieš D antigeną yra: $K (0,05) > c (0,0205) > E (0,0169) > Fy^a (0,0023) > Jk^a (0,0007)$ [64].

2.8. Anti – Rh antikūnų sukeltos komplikacijos

Kai priežastys yra susijusios su RhD antigenų – antikūnų nesuderinamumu, tai yra vadinama Rhexus sukeliomomis ligomis. Kliniškai Rh faktorius, kai ir ABO faktorius, gali sukelti sunkias medicines komplikacijas. Anti – RhD + antikūnai gali būti gaminami tų individų organizmuose, kurie yra RhD -, kaip rezultatas gavus netinkamą kraujo transfuziją. Kai tai įvyksta, tuomet antikūnų gamyba paprastai tęsiasi visą gyvenimą [30, 3, 12].

Tačiau didžiausia Rh kraujo grupių sistemos sukeliama problema nėra ta, kad pasitaiko nemažai transfuzinių nesuderinamumų (nors tai pasitaiko), bet ta, kuri sukelia hemolizinę naujagimių anemiją. Tai įvyksta tarp motinos ir jos iščiose besivystančio vaisiaus. Motinos hemoliziškai aktyvūs antikūnai, kurie yra nukreipti prieš gemalo eritrocitų antigenus, pereina per placentą. Tai dažniausiai IgG₁ izotopo antikūnai, gebantys anksti pereiti placentą ir kauptis gemalo kraujyje. Vaisiaus eritrocitus, kuriuos dengia IgG antikūnai, greitai šalina mononuklearinė fagocitinė sistema. Vaisius gali žūti arba susirgti NHL. Rhexus kraujo tipo nesuderinamumas vis dar yra potenciali vaisiaus kraujo giminingumo problemos priežastis naujagimiams [28, 29, 18, 27].

Rhexus tipo motinos – vaisiaus nesuderinamumas gali susidaryti įvairiais atvejais:

- jei Rh neigiama (dd) motina, yra ištekėjusi už būsimo kūdikio tėvo, kuris yra RhD teigiamas (DD arba Dd). Motina pagimdo RhD teigiamą (DD arba Dd) naujagimį. Gimdymo metu į moters kraujotaką gali patekti vaisiaus RhD + eritrocitų, kurie skatina anti – RhD antikūnų gamybą motinos organizme. Šie motinos antikūnai gali pereiti per placentą ir suardyti vaisiaus raudonąsias kraujo ląsteles. Pirmą kartą RhD – motinai besilaukiant RhD + kūdikio, paprastai nebūna nesuderinamumo problemų. Rizika

tam įvykti padidėja su kiekvienu tolimesniu nėštumu. To rezultatas būna sunki, gyvybei pavojinga anemija, kuria ką tik gimęs kūdikis gali susirgti, nes kraujyje atsiranda deguonies trūkumas. Kūdikis taip pat dažnai serga gelta (būkle, kurios metu tulžies pigmentai formuojasi kraujyje), karščiuoja, gali išsivystyti sunki kūno edema, pasižymi padidėjusiomis kepenimis bei tulžimi. Tai vadinama embrionine eritroblastoze. Šios pavojingos ligos gydymui šiuo metu yra taikomos RhD + kraujo skubios, masinės transfuzijos kūdikiui, tuo pat metu drenuojant tam, kad išvalytume dabartinį naujagimio kraują nuo RhD teigiamų antikūnų. Tai paprastai daroma tuojau pat po gimdymo, bet taip pat tai galima atlikti vaisiui ir iki jo gimimo. Europiečiams labiausiai yra tikėtina susidurti su šia problema – 13 % europiečių naujagimių priklauso rizikos grupei. Iš tikrųjų tik $\frac{1}{2}$ šių kūdikių (6% visų gimusių naujagimių) susiduria su komplikacijomis. Taikant profilaktinį gydymą šis skaičius gali dar sumažėti. Tik mažiau nei 1% kūdikių, kuriems buvo taikytas gydymas, susidūrė su problemomis [18, 22, 32, 27, 19, 25];

- motinai iki jos pirmojo nėštumo buvo perpilta RhD + kraujo. Todėl jau ir pirmojo nėštumo metu po kraujo perpylimo motinos organizme susidarę anti – RhD antikūnai gali sukelti NHL;

- savaime nutrūkęs ar dirbtinai nutrauktas nėštumas, nėštumo hipertoniija, prieš laiką atsidalijusi placenta, gimdymo skatinimas medikamentais, kai į moters kraujotaką patenka, kad ir nedidelis kiekis vaisiaus eritrocitų, kurie sensibilizuoja ir skatina gamintis anti – Rh IgG izotopo antikūnus. Kito nėštumo metu šie antikūnai atakuoja vaisiaus eritrocitus ir sukelia jų hemolizę.

Imunizacijai išvengti, RhD – motinai, turinčiai riziką pagimdyti RhD + kūdikį, šiuo metu yra plačiai taikomas serumas – RhoGAM – turintis savo sudėtyje anti – Rh IgG izotopo antikūnų. Jis paskiriamas moteriai, pasibaigus 28 nėštumo savaitei ir pakartotinai ne vėliau kaip 72 valandos po Rh + kūdikio gimimo. Tai turi būti padaryta pirmojo ir vėlesnių nėštumo metu. Suleisti antikūnai greitai agliutinoja visas vaisiaus raudonąsias kraujo ląsteles, jei tik jos pereina į motinos kraują, ir tuo būdu užkerta kelią gamintis jos pačios natūraliesiems antikūnams. Serumai suteikia tik pasyvią imunizacijos formą ir tada greitai palieka motinos kraujotaką, todėl motinos organizmas negali gaminti jokių ilgalaikių antikūnų. Šis gydymas gali būti efektyvus 99% ir taip užkirsti kelią NHL

vystimuisi. RhoGAM taip pat įprastai duodamas Rh – moterims po persileidimo, negimdinio nėštumo metu, įskaitant ir abortų atvejus [31, 19].

3. Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas:

Įvertinti kliniškai svarbių antikūnų prieš Rėzus kraujo grupių antigenus atsiradimą, paplitimą bei jų pasiskirstymą po hemotransfuzijų, ligoniams, kurie gydėsi Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose.

Darbo uždaviniai:

- 1) įvertinti Rėzus kraujo grupės aloantikūnų atsiradimą po hemotransfuzijų tyrimo pradžioje (2004 m.);
- 2) įvertinti Rėzus kraujo grupės aloantikūnų ir autoantikūnų paplitimą po ketverių metų (2008 m.);
- 3) įvertinti Rėzus kraujo grupės aloantikūnų ir autoantikūnų pasiskirstymą pagal ligos pobūdį.

4. EKSPERIMENTINĖ DALIS

4.1. Tyrimo medžiaga

4.1.1. Tiriamosios grupės

Tiriamasis darbas buvo atliekamas Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Laboratorinės diagnostikos centro Kraujo perpylimo laboratorijoje.

Tyrimų objektas – veninis kraujas be konservanto. Ėminiai buvo renkami Vilniaus universiteto ligoninėje Santariškių klinikose hospitalizuotiems ligoniams. Buvo tikimasi surasti antikūnų prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus.

Buvo ištirtas 115 pacientų kraujas. Tiriamųjų amžiaus ribos buvo nuo 18 iki 82 metų. Jiems buvo atliktas mažiausiai vienas kraujo perpylimas.

Aloantikūnų atsiradimas po hemotransfuzijų ir antikūnų pasiskirstymas buvo analizuojami ketverių metų laikotarpyje. Buvo analizuojama Vilniaus universiteto Santariškių klinikų archyvinė medžiaga.

4.1.2. Tiriamosios medžiagos surinkimas

Antikūnų paieškai ir identifikavimui atlikti, veninis kraujas imamas į vakuuminį mėgintuvėlį be antikoagulianto ar konservanto. Bandiniai centrifuguojami 5 min. 1500 apsisukimų per min. greičiu centrifugoje.

4.2. Tyrimo metodai

4.2.1. Reagentų aprašas

Tyrimams atlikti buvo naudoti kompanijos DiaMed-ID Micro Typing System reagentai:

- ID- kortelės „LISS / Coombs“, kuriuose naudojami paruošti ir suspenduoti gelyje polispecifinių (triušio anti- IgG ir monokloninis C3d) antiglobulinų serumai.
- Eritrocitų reagentai: ID- Dia Cell I, II, III; ID- DiaPanel. Tai paruošti naudojimui tipuoti standartiniai eritrocitai, skirti netiesioginio Kumbso mėginio atlikimui ieškant antikūnų ir juos identifikuojant.

- ID- Diluent-2 – eritrocitų paruošimo tirpalas, modifikuotas LISS (mažos joninės jėgos tirpalas).

4.2.2. Antikūnų (alo-, auto-) paieška

Antikūnų paieškai naudojame ID- Dia Cell (I, II, III) eritrocitų reagentus. Tiriamas serumas ir reagentai turi sušilti iki kambario temperatūros. Atitinkami ID- kortelės mikromėgintuvėliai pažymimi pagal tiriamojo ligonio numerį ir eritrocitų reagentus – I, II, III.

Į atitinkamai pažymėtus mikromėgintuvėlius pridedama po 50 µl ID- Dia Cell ir po 25 µl tiriamo serumo. Į mikromėgintuvėlį, skirta autologinei kontrolei atlikti, pridedam 50 µl paciento ląstelių mišinio.

ID- kortelės patalpinam 15 minučių į inkubatorių (t= 37°C). Vėliau ID- kortelės centrifuguojame 10 min 1500 apsisukimų per min. centrifugoje. Vertiname rezultata (nuo– iki 4+).

Neigiama reakcija rodo, kad tiriamajame serume nėra imuninių (alo-) antikūnų.

Jei reakciją gauname **teigiama** (serume yra imuninių antikūnų), įvedame reakcijos duomenis į specialią antigenų lentelę iš kurios ir sužinome apie antikūno specifiškumą. Antikūno patvirtinimui toliau atliekame antikūnų identifikavimą su ID-Dia Panel. Šių rezultatų patvirtinimui atliekame tiesioginę Kumbso reakciją. Atitinkama ID- kortelė pažymima pagal tiriamojo numerį. Į mikromėgintuvėlį pridedama 50 µl paruoštos tiriamų eritrocitų suspensijos 0,8 % (į 1ml. ID- Diluent-2 pridedam 10µl kraujo ir lengvai sumaišome). ID- kortelę įdedame į centrifugą 10 min., po to vizualiai vertiname rezultata [50].

4.2.3. Antikūnų identifikavimas

Naudojame paruoštus ID- Dia Panel eritrocitų reagentus (tai 11-os donorų eritrocitų mišiniai su žinomais antigenais, kurie aprašyti specialioje lentelėje). ID kortelės mikromėgintuvėliai pažymimi pagal tiriamojo ligonio numerį ir eritrocitų reagentus. Pridedama po 50 µl ID- Dia Panel į atitinkamai pažymėtus mikromėgintuvėlius (nuo 1 iki 11). Į 12- tą mikromėgintuvėlį, skirtą autologinei kontrolei, pridedame 50 µl ligonio eritrocitų suspensijos. Į visus 12 mikromėgintuvėlių pridedame po 25 µl tiriamo serumo.

LISS / Coombs ID- korteles patalpiname 15 minučių į inkubatorių ($t= 37^{\circ}\text{C}$). Vėliau ID- korteles centrifuguojame 10 min 1500 apsisukimų per min. greičiu. Vertiname rezultatus (nuo – iki 4+). Teigiama reakcija rodo antikūnų buvimą. Gautus reakcijos rezultatus įvedame į antigenų lentelę, kuri padeda nustatyti antikūno tipą (pastaba: autologinė kontrolė neigiama) [8, 14].

Teigiama reakcija su visomis ID-Dia Panel ląstelėmis ir neigiama autologinė kontrolė rodo kliniškai svarbių aloantikūnų buvimą.

Teigiama reakcija su visomis ID-Dia Panel ląstelėmis ir teigiama autokontrolė rodo autoantikūnų arba ir auto- ir aloantikūnų buvimą. Tokiam ligoniui tinkamo donoro kraujo nėra.

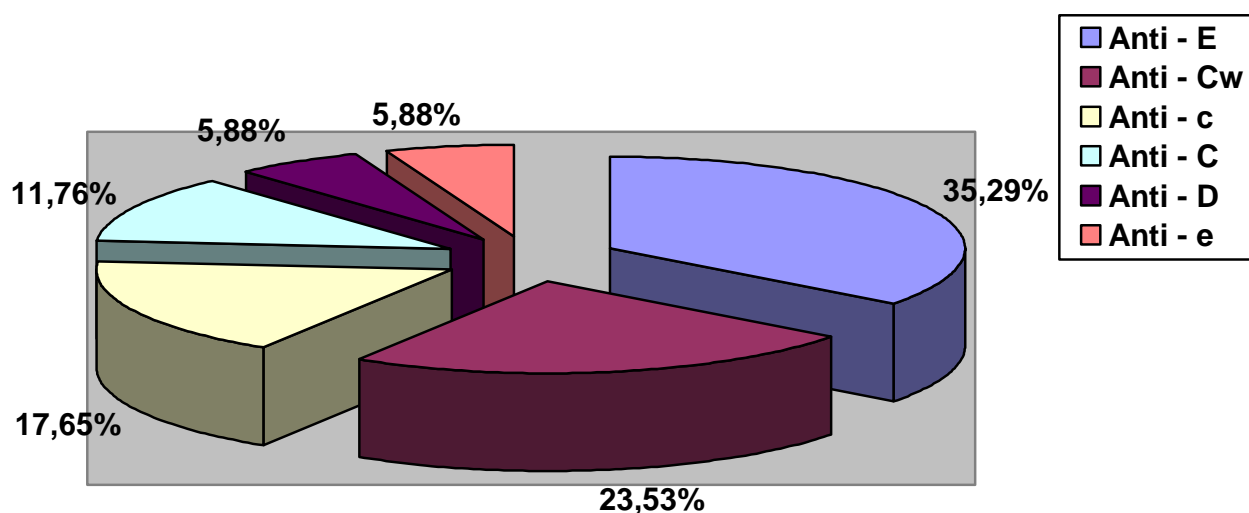
4.3. Statistinė duomenų analizė

Statistinis duomenų apdorojimas atliktas programomis Microsoft Excel. Duomenys pateikti apskaičiuavus aritmetinį vidurkį ir standartinius nuokrypius.

5. DARBO REZULTATAI

5.1. Aloantikūnų ir autoantikūnų atsiradimas po hemotransfuzijų

Laboratorinės diagnostikos centro, Kraujo perpylimo laboratorijoje, pirmaisiais tyrimo metais (2004 – 2005 m.), po alogeninių eritrocitų masės transfuzijų, 11 (9, 56%) iš 115 pacientų pirmą kartą buvo identifikuoti aloantikūnai prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus. Aloantikūnų prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus santykinis pasiskirstymas (%) parodytas 8 paveiksle (taip pat ir 1 priede).

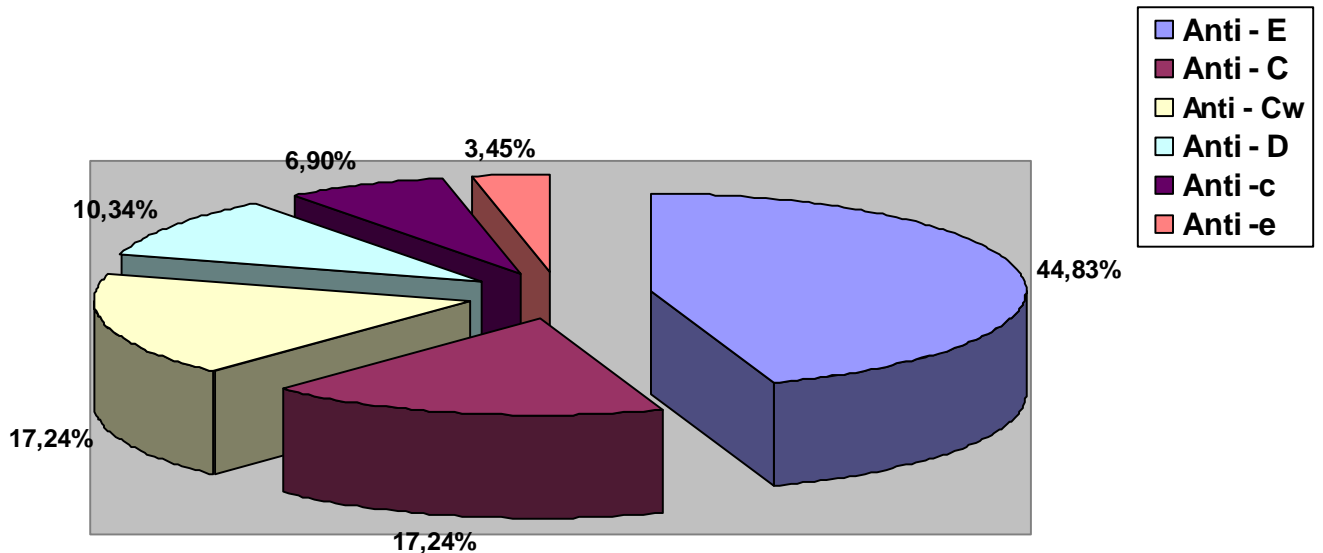


8 paveikslas. Aloantikūnų prieš Rhesus kraujo grupės sistemos antigenus atsiradusių 2004 – 2005 m., pasiskirstymas.

Nustatėme, kad pirmaisiais tyrimo metais dažniausiai identifikuoti aloantikūnai prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus buvo anti – E (35, 29%), anti – C^w (23, 53%) ir anti – c (17,65%), o rečiau – anti – C (11,76%), anti – D (5,88%) ir anti – e (5,88%) aloantikūnai.

Tyrimo pabaigoje (2007 – 2008 m.), po alogeninių eritrocitų masės transfuzijų, 22 (19,13%) iš 115 pacientų, pirmą kartą buvo identifikuoti aloantikūnai prieš Rh kraujo

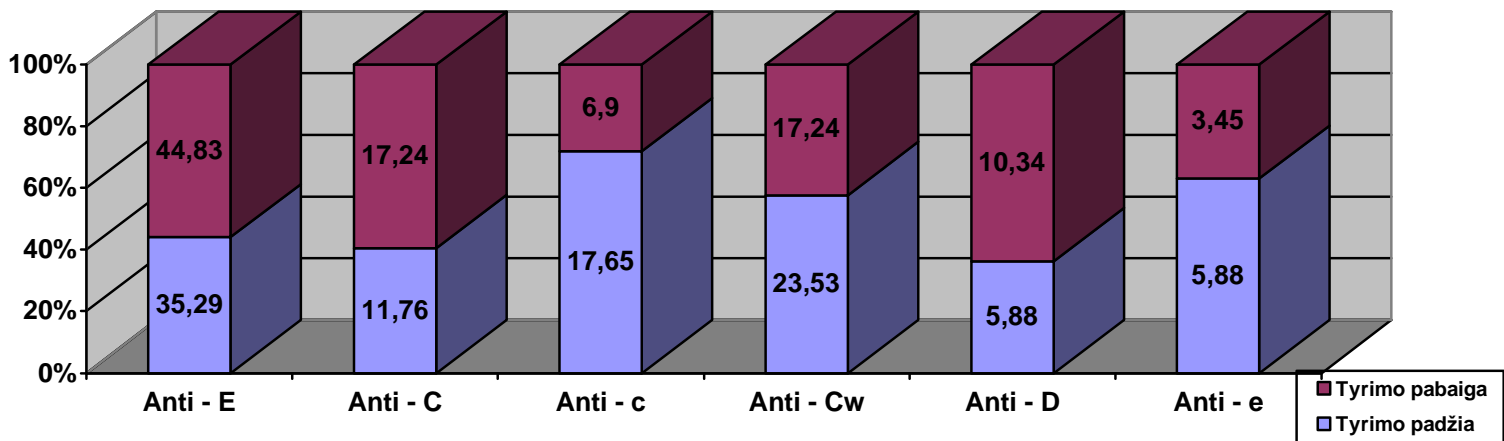
grupių sistemos antigenus. Aloantikūnų prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus santykinis pasiskirstymas (%) parodytas 9 paveiksle (taip pat ir 2 priede).



9 paveikslas. Aloantikūnų prieš Rhesus kraujo grupės sistemos antigenus, atsiradusių 2007 – 2008 m., pasiskirstymas.

Nustatėme, kad tyrimo pabaigoje dažniausiai identifikuoti aloantikūnai prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus buvo anti – E (44, 83%), anti – C^w (17,24%) ir anti – C (17,24%), o rečiau – anti – D (10,34%), anti – c (6,90%) ir anti – e (3,45%) aloantikūnai.

Aloantikūnų prieš Rhesus kraujo grupių antigenus pasiskirstymas (%) tyrimo pradžioje (2004 – 2005 m.) ir tyrimo pabaigoje (2007 – 2008 m.) pavaizduotas 10 paveiksle.

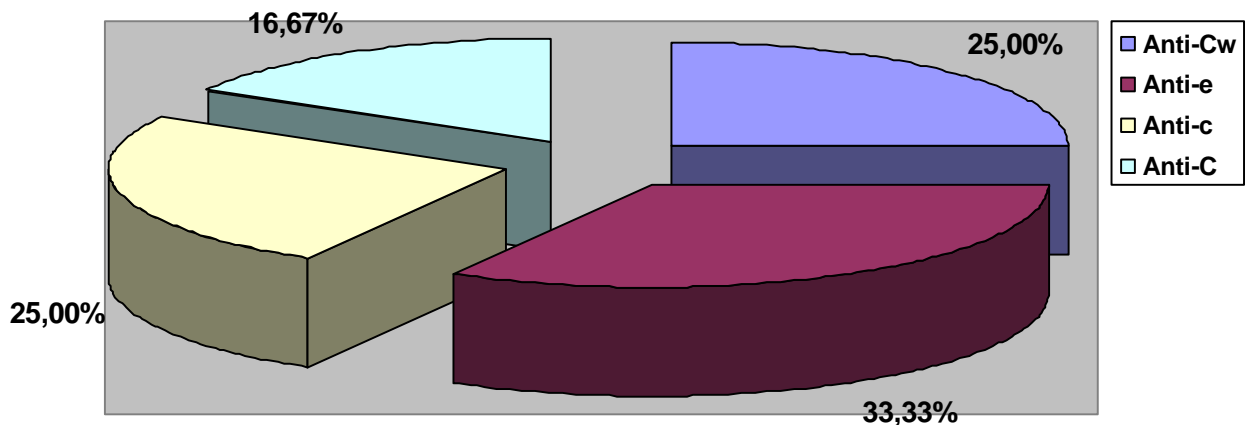


10 paveikslas. Aloantikūnų prieš Rhesus kraujo grupių antigenus pasiskirstymas tyrimo pradžioje ir tyrimo pabaigoje.

Lyginant tyrimų duomenis gautus tyrimo pradžioje (2004 – 2005 m.) ir tyrimo pabaigoje (2007 – 2008 m.), galime teigti, kad dažniausiai pirmą kartą identifikuojami aloantikūnai prieš Rh kraujo grupės antigenus buvo anti – E, ir anti – C^w, rečiau – anti – C, anti – c, anti – D ir anti – e.

Aloantikūnų prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus, atsiradimo rizika (aloimunizacijos rizika) pirmaisiais tyrimo metais siekė 9,56%, o tyrimo pabaigoje (2007 – 2008 m.) – 19,13%. Mūsų gauti duomenys neprieštaravo kitų tyrėjų pateiktiems duomenims, kur aloimunizacijos rizika siekia 1 – 38 % [4, 16, 52, 68]. Mūsų ir kitų tyrėjų palyginamoji rezultatų lentelė nr. 4 pateikta darbo priede.

Ištyrus 115 recipientų kraują, 9 (7,83 %) iš jų, tyrimo eigoje, po alogeninių eritrocitų masės transfuzijų atsirado autoantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemų antigenus. Autoantikūnų pasiskirstymas (%) pagal Rh sistemos antigenus parodytas – 11 paveiksle (taip pat ir 3 priede).

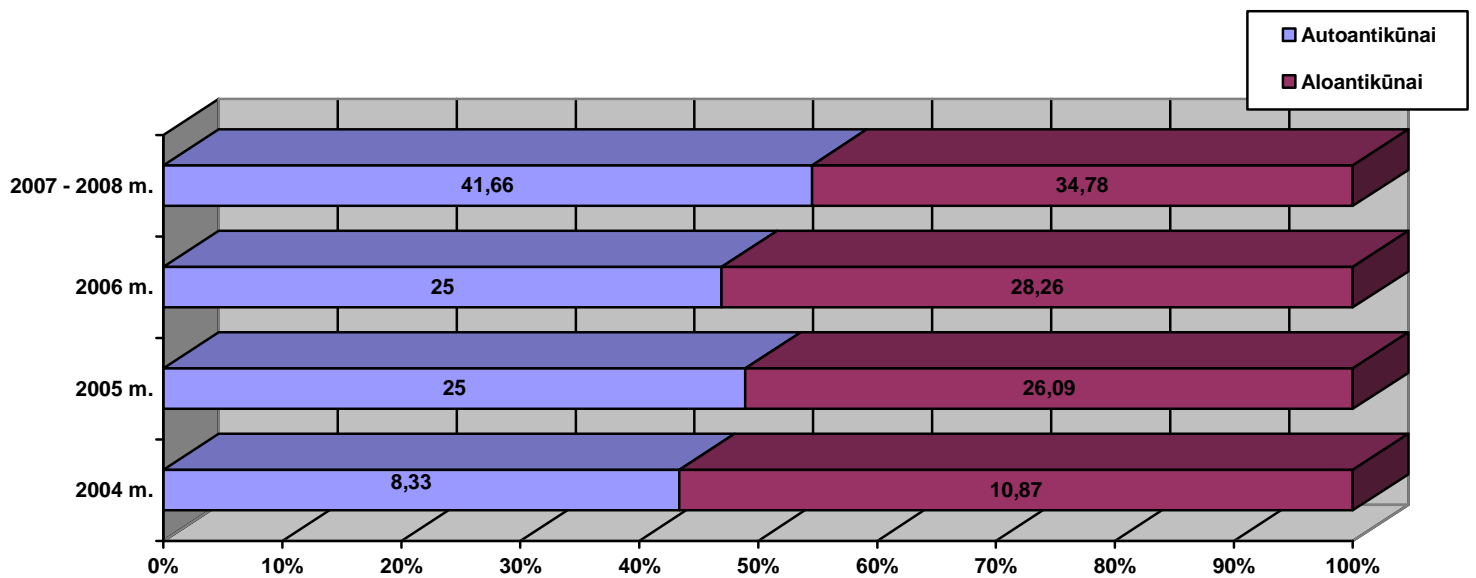


11 paveikslas. Autoantikūnų prieš Rhexus kraujo grupės sistemos antigenus, atsiradusių po hemotransfuzijų tyrimo eigoje, pasiskirstymas.

Nustatėme, kad dažniausiai atsirandantys autoantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus buvo anti – e (33,33%), anti – C^w (25,00%) ir anti – c (25,00%), o rečiau – anti – C (16,67%) autoantikūnai.

Autoantikūnų prieš Rh kraujo grupių antigenus, atsiradimą lemia biologiniai, fizikiniai ir cheminiai veiksniai (vaistai). Pakitus saviems antigenams jie tampa imunogenais, todėl prasideda autoantikūnų, prieš juos pačius, gamyba. Autoantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus gali atsirasti kaip sunkios ligos komplikacija, po aloimunizacijos ilgalaikių hemotransfuzijų metu, taip pat perpylus kraujo, kuriame jau yra aloantikūnų.

Autoantikūnų prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, atsiradimo rizika (aloimunizacijos rizika) siekė 7,83%. Kitų tyrėjų atliktais duomenimis, autoantikūnų prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, atsiradimo dažnis po aloimunizacijos hemotransfuzijų metu, siekia 8 – 25% [16]. Taigi, ir mūsų gauti tyrimų rezultatai neprieštaravo kitų tyrėjų pateiktiems duomenims.



12 paveikslas. Aloantikūnų ir autoantikūnų prieš Rhexus kraujo grupės sistemos antigenus, nustatytų tyrimo eigoje, pasiskirstymas (%).

Pagal gautus tyrimo duomenis galime teigti, kad pirmaisiais tyrimo metais (2004 m.) aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus buvo nustatyti 4 (10,87%), o autoantikūnai – 1 (8,33%) pacientui. 2005 m. aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus buvo nustatyti 7 (26,09%), o autoantikūnai – 2 (25,00%). 2006 m. aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus buvo nustatyti 10 (28,26%), o autoantikūnai – 2 (25,00%). 2007 – 2008 m. aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus buvo nustatyti 12 (34,78%), o autoantikūnai – 4 (41,66%).

Remiantis literatūros duomenimis, per paskutiniuosius 10 metų, mažiausiai 9 autoriai paskelbė, kad alogeninių masių transfuzijos sukelia ne tik aloantikūnų, bet ir autoantikūnų, nukreiptų prieš Rhexus kraujo grupių antigenus, gamybą [16, 45]. Tai ir atspindi 12 paveiksle pavaizduotas aloantikūnų ir autoantikūnų, nustatytų tyrimo eigoje pasiskirstymas.

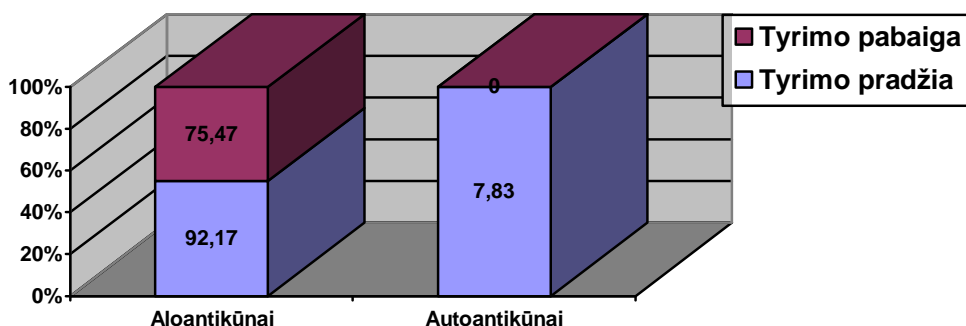
5.2. Rhexus kraujo grupės aloantikūnų ir autoantikūnų paplitimas

Iš 115 teigiamų, pagal tiesioginę ir/arba netiesioginę Kumbso reakcijas kraujo mėginių, tyrimo pradžioje (2004 m.), iš viso 106 (92,17 %) recipientams buvo nustatyti aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių antigenus, ir 9 (7,83 %) – autoantikūnai prieš Rh kraujo grupių antigenus.

Po ketverių metų, aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, iš viso buvo identifikuoti 80 (75,47%) pacientų. Autoantikūnų prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus nepavyko identifikuoti nei vienam iš recipientų (5 lentelė, 13 paveikslas).

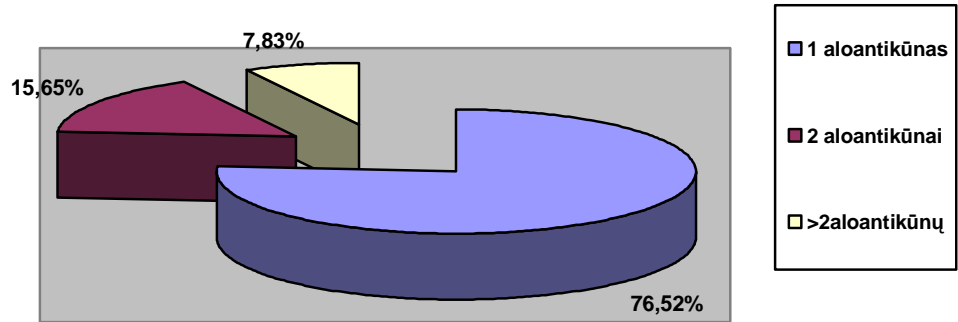
5 lentelė. Rasti ir identifikuoti antikūnai prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus.

	Antikūnai prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus tyrimo pradžioje (2004 m.)	Antikūnai prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus tyrimo pabaigoje (2008 m.)
	Recipientų skaičius	
Aloantikūnai	106	80
Autoantikūnai	9	0



13 paveikslas. Alo – ir autoantikūnų prieš Rh kraujo grupių antigenus pasiskirstymas (%) tyrimo pradžioje ir tyrimo pabaigoje .

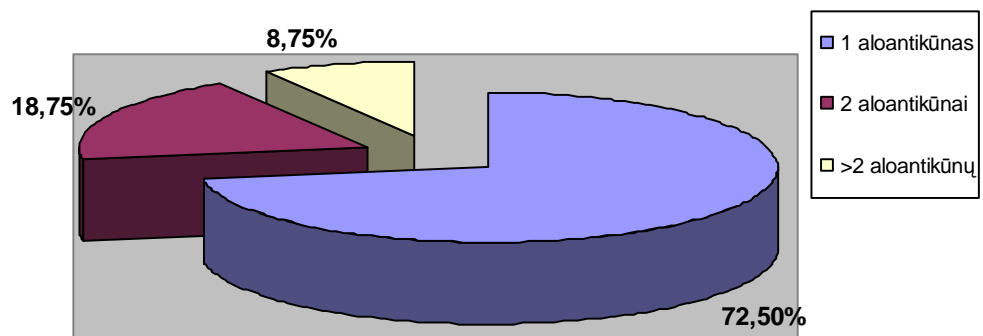
Pirmaisiais tyrimų metais (2004 – 2005 m.) po vieną aloantikūną prieš Rhexus kraujo grupės sistemos antigenus turėjo 76,52%, po du – 15,65% daugiau nei po du aloantikūnus – 7,83 % recipientų (14 paveikslas).



14 paveikslas. Tyrimo pradžioje nustatytų aloantikūnų prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus santykis (%).

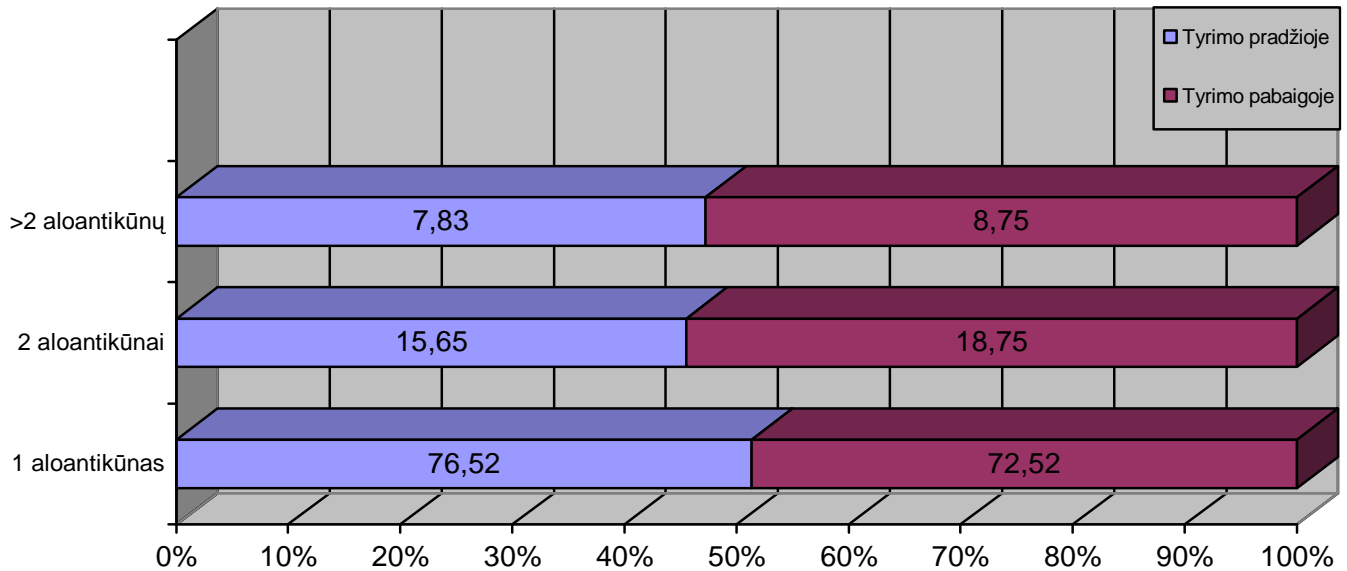
Po atliekamų hemotransfuzijų, ketvirtaisiais tyrimo metais 22 recipientams (19,13%) Laboratorinės diagnostikos centro, Kraujo perpilimo laboratorijoje pirmą kartą buvo identifikuoti 29 aloantikūnai prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus, o 16 (13,91%) recipientų išnyko 22 aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus.

Tyrimo pabaigoje (2007 – 2008 m.) po vieną aloantikūną prieš Rh kraujo grupės antigenus turėjo 72,50 %, po du – 18,75 %, daugiau nei po du aloantikūnus – 8,75 % recipientų (15 paveikslas).



15 paveikslas. Tyrimo pabaigoje nustatytų aloantikūnų prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus santykis (%).

Tyrimo pradžioje ir pabaigoje nustatytų aloantikūnų, prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, skaičiaus palyginimas pavaizduotas 16 paveiksle:



16 paveikslas. Tyrimo pradžioje ir tyrimo pabaigoje, tiriamiesiems nustatytų aloantikūnų prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus pasiskirstymas (%).

Pagal gautus tyrimo duomenis galime teigti, kad aloantikūnų prieš Rh kraujo grupių antigenus pasiskirstymas tiek tyrimo pradžioje, tiek ir tyrimo pabaigoje yra panašus.

Kiti tyrėjai, kurie taip pat analizavo antikūnų prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus paplitimą, paskelbė panašius rezultatus. Mūsų gauti duomenys neprieštaravo kitų tyrėjų duomenims, kur po 1 aloantikūną prieš Rh sistemos antigenus turėjo 66,67 – 85,0 %, po keletą aloantikūnų prieš Rh sistemos antigenus – 15,0 – 27,45 %, ir po daugiau nei du aloantikūnus prieš Rh sistemos antigenus turėjo 15,0 – 2,08 % [62, 63, 64, 69] (palyginamoji rezultatų lentelė nr. 5 darbo priede).

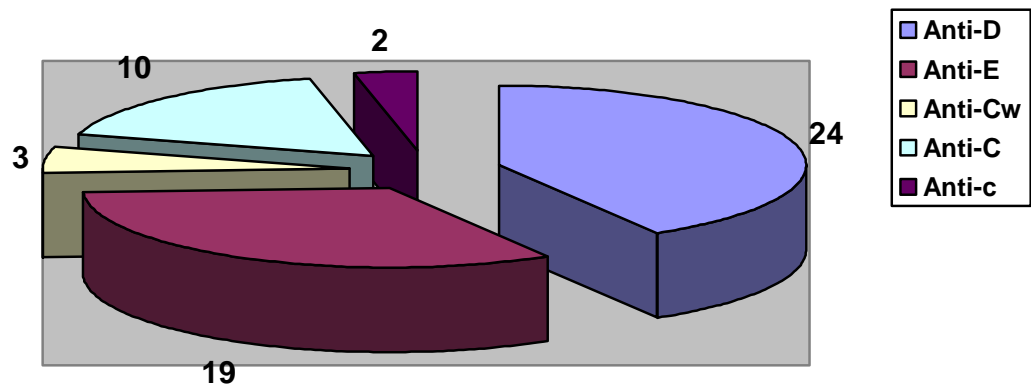
Iš viso buvo identifikuota 123 aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus 80 – čiai tiriamųjų.

Dažniausiai sutinkami aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus buvo anti - D (n= 24) ir anti - E (n= 19), o dažniausiai sutinkamos aloantikūnų kombinacijos – anti –(D + C) (n = 3), anti – (E + C^w) (n = 4), anti – (E + c) (n = 3), anti – (D + C + E) (n = 5) (6 lentelė).

6 lentelė. Aloantikūnų prieš antigenines struktūras paplitimas ir specifiškumas.

Aloantikūnai prieš antigenines struktūras	Aloantikūnų prieš Rzezus sistemos antigenus pasiskirstymas (n= 80)
1 aloantikūnas (n=58)	E (19), D (24), C ^w (3), C (10), c (2)
2 aloantikūnai (n=15)	D+ C (3), C+ C ^w (1), E+ C ^w (4), E+ c (3), C +E (2), C + c (1), D + E (2), D+ C ^w (1),
>2 aloantikūnai (n=7)	E+ c+ C ^w (1), D+ C+ E (5), e+ C+ C ^w (1)

Nustatėme, kad didžiausias aloantikūnų prieš Rh kraujo grupės antigenus paplitimas buvo stebimas prieš E (n = 19) ir D (n = 24) antigenus, o mažiausias – prieš c (n = 2) ir e antigenus (n = 0) (17 paveikslas).



17 paveikslas. Aloantikūnų paplitimas (n = 58) Rzezus kraujo grupių sistemoje tiriamuoju laikotarpiu.

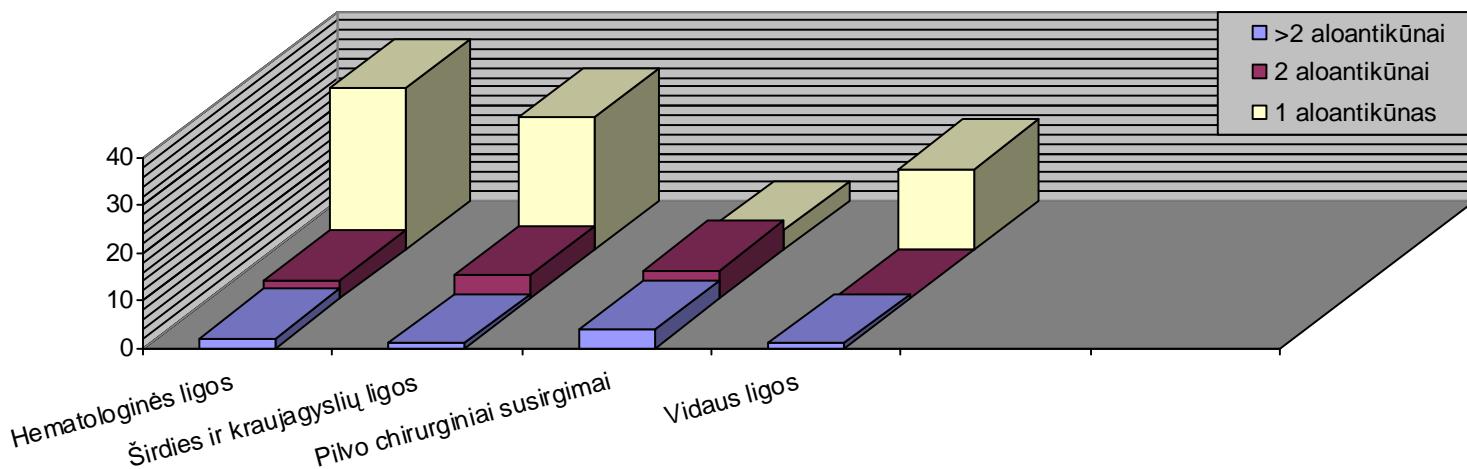
Lyginant mūsų ir kitų tyrėjų duomenis, rezultatai skyrėsi, nes kitų tyrėjų duomenimis didžiausias aloantikūnų paplitimas yra stebimas prieš E antigeną, mažesnis – prieš C, Cw ir D antigenus [56, 63, 64, 69]. Mūsų ir kitų tyrėjų palyginamoji rezultatų lentelė nr. 6 yra pateikta darbo priede.

5.3. Antikūnų prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus pasiskirstymas pagal susirgimo pobūdį

Pirmaisiais tyrimo metais (2004 – 2005 m.), aloantikūnai prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus, Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose, pagal susirgimo pobūdį pasiskirstė taip (7 lentelė, 18 paveikslas):

7 lentelė. Tiriamųjų, kuriems buvo rasti aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus tyrimo pradžioje, pasiskirstymas pagal susirgimo pobūdį.

Susirgimo pobūdis	Ligonų skaičius
Hematologinės ligos	40
Širdies ir kraujagyslių ligos	43
Pilvo chirurginiai susirgimai	14
Vidaus ligos	18
Viso:	106



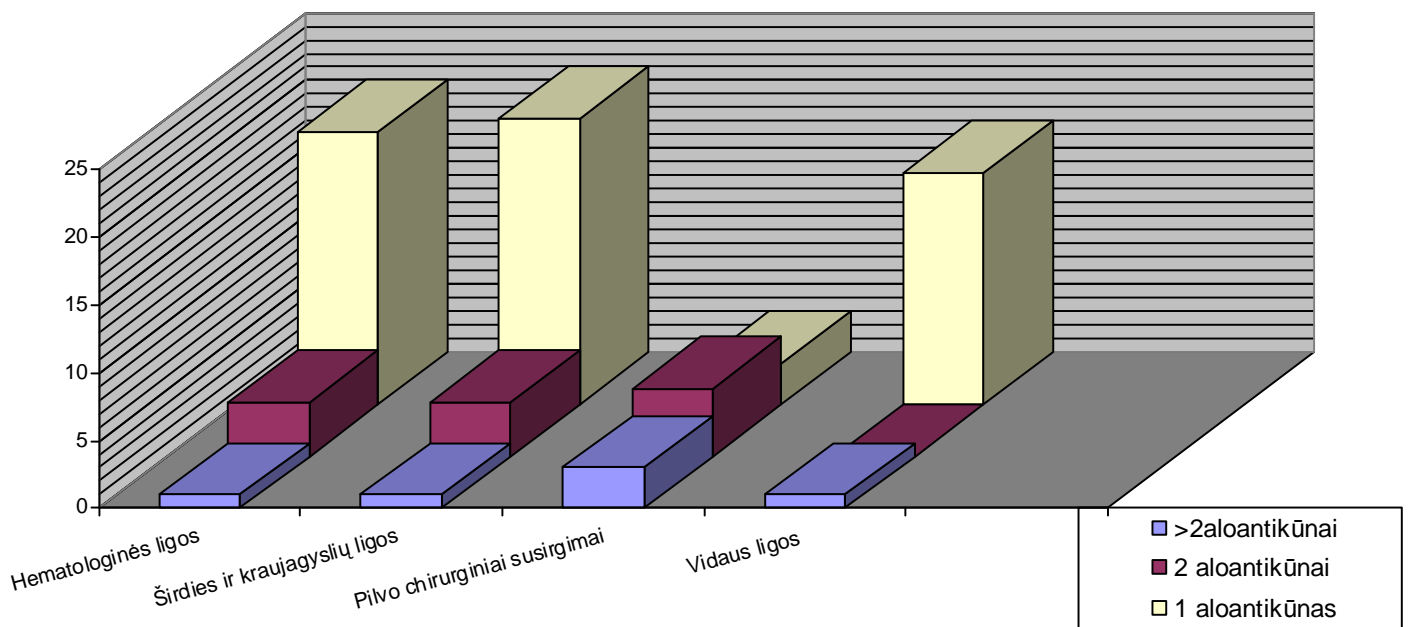
18 paveikslas. Aloantikūnų prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus pasiskirstymas (n = 106) tyrimo pradžioje.

Nustatėme, kad tyrimo pradžioje 34 iš 40 hematologinėmis ligomis sergančių pacientų buvo identifikuoti po 1 aloantikūną prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, 4 – po 2 aloantikūnus ir 2 pacientams- daugiau nei po 2 aloantikūnus. 28 iš 43 pacientų sergančių širdies ir kraujagyslių ligomis buvo identifikuoti po 1 aloantikūną prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, 5 – po 2 aloantikūnus ir 1 – daugiau nei 2 aloantikūnai. 4 iš 14 pacientų, su pilvo chirurginiais susirgimais buvo identifikuoti po 1 aloantikūną prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, 6 – po 2 aloantikūnus ir 2 – daugiau nei po 2 aloantikūnus. 17 iš 18 pacientų sergančių įvairiomis vidaus ligomis buvo identifikuoti po 1 aloantikūną prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, po 2 aloantikūnus nebuvo identifikuota nei vienam iš pacientų ir 1 pacientui – daugiau nei 2 aloantikūnai.

Ketvirtaisiais tyrimo metais, aloantikūnai prieš Rhesus kraujo grupių antigenus, Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose pagal susirgimo pobūdį pasiskirstė taip (8 lentelė, 19 paveikslas):

8 lentelė. Tiriamųjų, kuriems buvo rasti aloantantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus tyrimo pabaigoje, pasiskirstymas pagal susirgimo pobūdį.

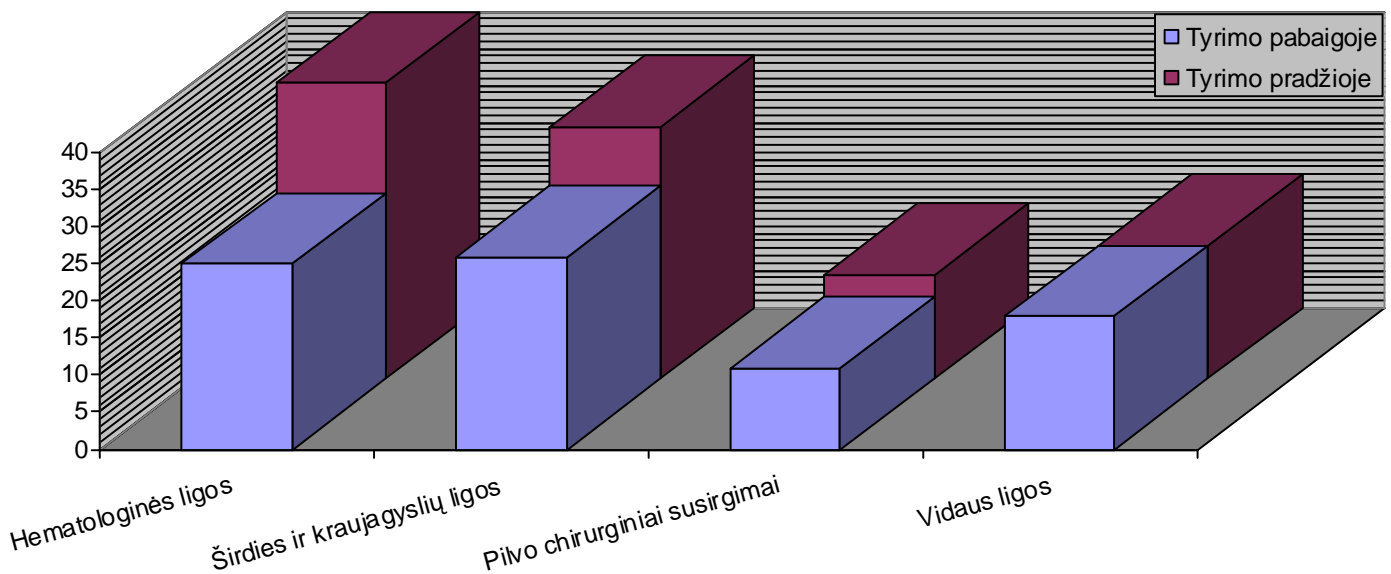
Skyrius	Ligonių skaičius
Hematologinės ligos	25
Širdies ir kraujagyslių ligos	26
Pilvo chirurginiai susirgimai	11
Vidaus ligos	18
Viso:	80



19 paveikslas. Aloantikūnų prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus pasiskirstymas (n = 80) tyrimo pabaigoje.

Nustatėme, kad tyrimo pabaigoje 20 iš 25 hematologinėmis ligomis sergančių pacientų buvo identifikuoti po 1 aloantikūną prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, 4 – po 2 aloantikūnus ir 1 pacientui - daugiau nei 2 aloantikūnai. 21 iš 26 pacientų sergančių širdies ir kraujagyslių ligomis buvo identifikuoti po 1 aloantikūną prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, 4 – po 2 aloantikūnus ir 1 – daugiau nei 2 aloantikūnai. 3 iš 11

pacientų, su pilvo chirurginiais susirgimais buvo identifikuoti po 1 aloantikūną prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, 5 – po 2 aloantikūnus ir 3 – daugiau nei po 2 aloantikūnus. 17 iš 18 pacientų sergančių įvairiomis vidaus ligomis buvo identifikuoti po 1 aloantikūną prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, po 2 aloantikūnus nebuvo identifikuota nei vienam iš pacientų ir 1 pacientui – daugiau nei 2 aloantikūnai.



20 paveikslas. Tiriamųjų, kuriems buvo nustatyti aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių antigenus, pasiskirstymas pagal susirgimo pobūdį tyrimo pradžioje ir pabaigoje.

Pastebėta tendencija, kad hematologinėmis bei chirurginėmis ligomis sergantiems pacientams, aloantikūnų prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus kaita yra tokia didelė, nes šiems pacientams yra nuolat atliekamos hemotransfuzijos. H. Schonewille ir bendraautorijų teigimu, tokiems pacientams keturis kartus dažniau atsiranda ne vienas, o keletas ar daugiau antikūnų [15, 59, 62, 63].

6. REZULTATŲ APTARIMAS

Šiame darbe tyrėme antikūnų prieš Rhesus kraujo grupių antigenus atsiradimą, paplitimą bei jų pasiskirstymą pagal susirgimo pobūdį po hemotransfuzijų. Tiriamieji – Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose besigydančios ligonios.

Buvo ištirtas 115 recipientų kraujas. Tiriamųjų amžiaus ribos buvo nuo 18 iki 82 metų.

Darbo tikslui įgyvendinti buvo išskirti trys uždaviniai, kurių rezultatus aptarsime:

a) įvertintas kliniškai svarbios, Rhesus kraujo grupės aloantikūnų ir autoantikūnų atsiradimas po hemotransfuzijų.

Aloantikūnai po kraujo perpylimų atsiranda eritrocitų membranoje esantiems antigenams patekus į organizmą, kuris šių antigenų neturi. Analizuojant Vilniaus universiteto Santariškių klinikų archyvinę medžiagą, nustatėme, kad Laboratorinės diagnostikos centro, Kraujo perpylimo laboratorijoje, pirmaisiais tyrimo metais (2004 – 2005 m.), po alogeninių eritrocitų masės transfuzijų, 11 (9, 56%) iš 115 pacientų, pirmą kartą buvo identifikuoti aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus. Taigi, antikūnų atsiradimo rizika (aloimunizacijos rizika) pirmaisiais tyrimo metais siekė 9,56%. Ištyrus šių, 115 recipientų kraują, 22 (19,13 %) iš jų, tyrimo pabaigoje (2007 – 2008 m.) pirmą kartą identifikuoti aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus. Aloimunizacijos rizika šiuo atveju siekė 19,13%. Mūsų gauti duomenys neprieštaravo kitų tyrėjų pateiktiems duomenims, kur aloimunizacijos rizika siekia 1 – 38 % [15, 59, 56, 61, 62, 65].

Tačiau, ketverių metų laikotarpyje 16 (13,91%) recipientų išnyko 22 aloantikūnai prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus.

Tyrimo eigoje 9 recipientams (aloimunizacijos rizika - 7,83 %), po alogeninių eritrocitų masės transfuzijų atsirado autoantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus. Autoantikūnų atsiradimą lemia biologiniai, fizikiniai ir cheminiai veiksniai (vaistai). Pakitus saviems antigenams jie tampa imunogenais, todėl prasideda autoantikūnų, prieš juos pačius, gamyba. Autoantikūnai gali atsirasti kaip sunkios ligos komplikacija, po aloimunizacijos ilgalaikių hemotransfuzijų metu, taip pat perpylus kraujo, kuriame jau yra aloantikūnų. Remiantis literatūros duomenimis, per

paskutiniuosius 10 metų, mažiausiai 9 autoriai paskelbė, kad alogeninių eritrocitų masių transfuzijos sukelia ne tik aloantikūnų, bet ir autoantikūnų prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus, gamybą. Atliktų tyrimų duomenimis, autoantikūnų atsiradimo dažnis po aloimunizacijos hemotransfuzijų metu, siekia 8 – 25% [16, 45].

b) įvertintas kliniškai svarbios Rhesus kraujo grupės aloantikūnų ir autoantikūnų paplitimas. Nustatėme, kad tyrimo pradžioje iš viso 106 (92,17 %) tiriamieji turėjo aloantikūnus prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, ir tik 9 (7,83 %) – autoantikūnus prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus.

Ketvirtaisiais tyrimo metais aloantikūnai prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus buvo identifikuoti iš viso 80 (75,47%) pacientų. Autoantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus nebuvo identifikuoti nei vienam iš recipientų.

Toliau analizavome tik aloantikūnų paplitimą laiko atžvilgiu. Nustatėme, kad pirmaisiais tyrimo metais po vieną aloantikūną prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus turėjo 76,52 %, po du – 15,65 %, daugiau nei po du aloantikūnus – 7,83 % tiriamųjų pacientų. H. Schonewille ir bendraautoriai, analizavę antikūnų prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus paplitimą, paskelbė panašius rezultatus [62, 64]. Mūsų duomenys neprieštaravo šių autorių duomenims, kur po 1 aloantikūną prieš Rh sistemos antigenus turėjo 66,67 – 85,0%, po keletą aloantikūnų prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus – 15,0 – 27,45 %, ir po daugiau nei du aloantikūnus prieš Rh sistemos antigenus turėjo 15,0 – 2,08 % [63, 69, 15, 59, 62].

Po ketverių metų, po vieną aloantikūną prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus jau teturėjo tik 72,50 %, po du – 18,75 %, daugiau nei po du aloantikūnus – 8,75 % tiriamųjų asmenų.

Iš viso buvo identifikuota 120 aloantikūnų prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus, 80 – čiai tiriamųjų.

Dažniausiai sutinkami Rh kraujo grupių sistemos aloantikūnai buvo prieš D (n = 24) ir E (n = 19) antigenus, o dažniausiai sutinkamos Rh sistemos aloantikūnų kombinacijos: anti – (D + C) (n = 3), anti – (E + C^w) (n = 4), anti – (E + c) (n = 3), anti – (D + C + E) (n = 5). Panašius rezultatus paskelbė ir H. Schonewille su bendradarbiais: dažniausios jų sutinkamos kombinacijos buvo anti – (D + C), anti – (E + c). Gauti

rezultatai atitiko literatūroje pateiktus duomenis, kad anti – E dažnai veikia su anti – c, o anti – C – kartu su anti – D arba anti – C^w [6, 52, 60, 62, 63].

Siekdami įvertinti aloantikūnų pasiskirstymą nustatėme, kad didžiausias aloantikūnų paplitimas buvo stebimas prieš D antigeną. Nustatėme, kad labiausiai paplitę antikūnai po anti - D buvo prieš E, C, mažiau – prieš C^w antigeną. Mažiausias paplitimas buvo stebimas prieš Rh kraujo grupės anti-c aloantikūną, o anti-e aloantikūnų mūsų tiriamajame darbe nebuvo nustatyta. Čia, lyginant mūsų ir kitų tyrėjų duomenis, rezultatai skyrėsi, nes kitų tyrėjų duomenimis didžiausias aloantikūnų paplitimas yra stebimas prieš E antigeną, mažesnis – prieš C, C^w ir D antigenus [56, 63, 64, 69].

c) įvertintas antikūnų pasiskirstymas pagal susirgimo pobūdį.

Nustatėme, kad labiausiai aloantikūnų prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus radimas keitėsi ligonių, sergančių hematologinėmis ligomis, tarpe (tyrimo pradžioje aloantikūnai buvo aptikti 40 asmenų, o pabaigoje – tik 25 pacientams), esant širdies ir kraujagyslių chirurginiams susirgimams (tyrimo pradžioje aloantikūnai buvo aptikti 34, o vėliau – tik 26 asmenims), pilvo chirurginių susirgimų (tyrimo pradžioje aloantikūnai aptikti 14, o pabaigoje – tik 11 pacientų) atvejais. Pastebėta tendencija, kad hematologinėmis bei chirurginėmis ligomis sergantiems pacientams, aloantikūnų prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus kaita yra tokia didelė, nes šiems pacientams yra nuolat atliekamos hemotransfuzijos. H. Schonewille ir bendraautorių teigimu, tokiems pacientams keturis kartus dažniau atsiranda ne vienas, o keletas ar daugiau antikūnų [15, 59, 62, 63].

Pastebėta, kad nustatytas pacientų, kuriems buvo aptikti aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, skaičius tyrimo pradžioje išliko nepakitęs tiek ir tyrimo pabaigoje sergančių įvairiomis vidaus ligomis (antikūnų prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus buvo 18).

Išanalizavę šio tyrimo rezultatus galime teigti, kad pacientams, kuriems ateityje bus planuojamos taikyti ilgalaikės hemotransfuzinės terapijos, rekomenduotina nustatyti Rhesus fenotipą ir antikūnus prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus. Apie nustatytus aloantikūnus rekomenduojama pažymėti paciento ligos istorijoje.

7. IŠVADOS

1. Po alogeninių eritrocitų masės transfuzijų, pirmaisiais tyrimo metais, 9,56 % recipientų pirmą kartą buvo identifikuoti aloantikūnai prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus. 19,13 % recipientų aloantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus pirmą kartą identifikuoti tyrimo pabaigoje. 7,83 % pacientų, tyrimo eigoje atsirado autoantikūnai prieš Rh kraujo grupių sistemų antigenus.

2. Iš viso, pirmaisiais tyrimo metais, aloantikūnai prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus nustatyti 92,17 % recipientų. Ketvirtaisiais tyrimo metais, aloantikūnai prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus, iš viso buvo identifikuoti 75,47 % pacientų. Didžiausiais aloantikūnų paplitimas buvo stebimas prieš D antigeną, mažesnis - prieš E, C, ir C^w antigenus.

3. Aloantikūnų prieš Rhesus kraujo grupių sistemos antigenus aptikimo dinamika būdingiausia hematologinių, širdies ir kraujagyslių bei pilvo chirurginių susirgimų atvejais.

SUMMARY

The Origin and the Incidence of Antibodies against Rhesus Blood System Antigens

This research work was carried out seeking to assess origin and incidence of antibodies against antigens of Rhesus Blood Type system as well as their distribution after hemotransfusions.

Blood of 115 recipients was explored in patients treated at Vilnius University hospital „Santariškių klinikos”. The age of the persons under research varied between 18 and 82 years. Appearance and spread of antibodies against antigens of Rhesus Blood Type system was established using the direct and indirect Coombs test.

We had explored the risk of alloimmunization of antibodies against antigens of Rhesus Blood Type system within the period of four years. The risk of alloimmunization of alloantibodies against antigens of Rhesus Blood Type system, which we found on the first time within the first year of research was 9.56 %. And in the end of research, the risk of alloimmunization of alloantibodies against antigens of Rhesus Blood Type system, which we found on the first time was 19.13 %.

On the whole, within the first year of research, alloantibodies against antigens of Rhesus Blood Type system were identified in 92.17 % of the patients, and the autoantibodies against antigens of Rhesus Blood Type – in 7.83 % of the patients. Within the fourth year of research, in total 75.47 % of the patients were identified alloantibodies against antigens of Rhesus Blood Type system, and the autoantibodies against antigens of Rhesus Blood were not found in patients.

Most frequently, alloantibodies of Rhesus Blood Type system were presented by the ones against D antigens (n = 24) and E antigens (n = 19); the most frequent combinations of antibodies of Rh Blood Type system were: anti – (D + C) (n = 3), anti – (E + C^w) (n = 4), anti – (E + c) (n = 3) and anti – (D + C + E) (n = 5).

An archetypal dynamics of detection of alloantibodies against antigens of Rhesus Blood Type system were among patients ill with hematological diseases, cardiac and cardiovascular diseases, and with surgical diseases of the abdominal zone.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkuju VU MF Fiziologijos, biochemijos ir laboratorinės medicinos katedros lekt. dr. Loretai Bagdonaitei ir VULSK LDC Kraujo perpylimo laboratorijos vyr. ordinaatorei – laboratorijos gyd. Vidai Betingienei už pagalbą viso darbo metu.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adomaitienė D., Janulevičiūtė N., Kazakevičius R., Vaičiuvėnas V. Klinikinės imunologijos įvadas. Kaunas, 2001. P. 61- 81
2. American Association of Blood Banks records repertory 2002. P.147, 163
3. American Red Cross Blood Services, New England Region, Maine, Massachusetts, New Hampshire, Vermont (2001). Retrieved on 2006-11-14.
4. Arndt- Hanser A. Coombs- Primer. The Anti- Human Globulin Test (Coombs Test), 5th edition. Transfusion Center of the University Clinic. Germany, 1990. P. 3-8.
5. Asfour M, Narvios A, Lichtiger B. Transfusion of RhD-incompatible blood components in RhD-negative blood marrow transplant recipients. *MedGenMed* 2004; 6: 22.
6. Austin Community College. Rh Blood Group System. MLAB 2431. IMMUNOHEMATOLOGY COURSE OUTLINE/OBJECTIVES LECTURE GUIDE. Spring 2005 P. 1-3
7. [Byers BD](#), [Gordon MC](#), [Higby K](#). Severe hemolytic disease of the newborn due to anti-Cw. [Obstet Gynecol.](#) 2005 Nov;106(5 Pt 2):1180-2
8. Cate J. C., Reilly N. Evaluation and implementation of the gel test for indirect antiglobulin testing in a community hospital laboratory. [Archives of Pathology & Laboratory Medicine.](#) 1999.Vol.123, Issue. 8; 693-695
9. Christine A., Wheeler M. D., Calhoun L., Blackall D. P. Warm Reactive Autoantibodies Clinical and Serologic Correlations. *Am. Journal of Clinical Pathology.* 2004, 122 (5): 680-685
10. Čepulienė R. Kraujo morfologija ir funkcijos: metodinė priemonė. Vilnius: Vilniaus pedagoginio universiteto leidykla, 2007. P. 5, 45 – 48.
11. Daniels G. L., Fletcher A., Garratty G., Henry S., Jorgensen J., Judd W. J., Levene C. et al. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sanguinis.* 2004, 87: 304- 316
12. Dean L. The ABO blood group. *Blood groups and Red Cell Antigens.* Online: NCBI

13. Dettke M., Hocker P. Klinikinė transfuziologija. Gydymas krauju ir jo komponentais. Kraujo grupių serologijos ir transfuziologijos klinika. Viena 2003. P.9, 12, 24.
14. DiaMed- ID Micro Typing Systems kompanijos metodiniai nurodymai vartotojui. LR SAM Sprendimas Nr. 2- 128:1994. P. 46- 50
15. Fluit C. R., Kunts V. A., Drenthe- Schonk A. M. Incidence of red cell antibodies after multiple blood transfusion. Transfusion, 1990; 30: 532-535
16. Garratty G., PhD, FRCPath. Autoantibodies induced by blood transfusion. Transfusion, 2004; Vol44, Issue1, P. 5
17. Garratty G., Telen M. J., Petz L. D. Red cell antigens as functional Molekules and obstacles to transfusion. Hematology, 2002 (1) P. 445.
18. [http:// www.annalsnyas.org/cgi/content/full/1075/1/88](http://www.annalsnyas.org/cgi/content/full/1075/1/88).
19. [http:// www.anthro.palomar.edu/blood/Rh_system.htm](http://www.anthro.palomar.edu/blood/Rh_system.htm).
20. [http:// www.ausis.gf.vu.lt/mg/hr/2000/01/1gair.html](http://www.ausis.gf.vu.lt/mg/hr/2000/01/1gair.html).
21. [http:// www.ausmers.com/topic](http://www.ausmers.com/topic).
22. [http:// www.biology.arizona.edu/human_bio/problem_sets/blood_types/rh_factor.html](http://www.biology.arizona.edu/human_bio/problem_sets/blood_types/rh_factor.html).
23. [http:// www.bookrags.com/research/blood_type-gen-01](http://www.bookrags.com/research/blood_type-gen-01).
24. [http:// www.dedamo.com/wiki/wiki.pl/Imunoglobulins](http://www.dedamo.com/wiki/wiki.pl/Imunoglobulins).
25. [http:// www.Discoveries_in_medicine.com/Ra-Thy/Rh-factor.html](http://www.Discoveries_in_medicine.com/Ra-Thy/Rh-factor.html).
26. [http:// www.drhull.com/EncyMaster/R/Rh_factor.html](http://www.drhull.com/EncyMaster/R/Rh_factor.html).
27. [http:// www.drhull.com/EncyMaster/R/Rh_factor_incompantibility.html](http://www.drhull.com/EncyMaster/R/Rh_factor_incompantibility.html).
28. [http:// www.en.wipipedia.org/wiki/Rhезus_blood_group_system](http://www.en.wipipedia.org/wiki/Rhезus_blood_group_system).
29. [http:// www.en.wikipedia.org/Rhезus_diseases](http://www.en.wikipedia.org/Rhезus_diseases).
30. [http:// www.en.wikipedia.org/wiki/Blood_type](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Blood_type).
31. [http:// www.en.wikipedia.org/wiki/Rho%28D%29/immune_globulin](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Rho%28D%29/immune_globulin).
32. [http:// www.infoplease.com/ce6.html](http://www.infoplease.com/ce6.html).
33. [http:// www.itxm.org/Archive/tul-94.htm](http://www.itxm.org/Archive/tul-94.htm)
34. [http:// www.yahoo.com/questions/Rh_blood_Types](http://www.yahoo.com/questions/Rh_blood_Types).
35. [http:// www.jdaross.cwc.net/images/igm.gif](http://www.jdaross.cwc.net/images/igm.gif).
36. [http:// www.medicus.lt/studentai/?sO=kraujo_grupes](http://www.medicus.lt/studentai/?sO=kraujo_grupes).

37. [http:// www.med.puslapiai.lt/transfuziol.php](http://www.med.puslapiai.lt/transfuziol.php).
38. [http:// www.pim.medicine.dal.ca/atg.htm](http://www.pim.medicine.dal.ca/atg.htm).
39. [http:// www.Pubmedcentral.nih.gov/article_render](http://www.Pubmedcentral.nih.gov/article_render).
40. [http:// www.Sciencelinks.jp/j-east/article/200624.php](http://www.Sciencelinks.jp/j-east/article/200624.php)
41. [http:// www.speros.lt/ABO_kraujo_grupių_sistema/referatas](http://www.speros.lt/ABO_kraujo_grupių_sistema/referatas).
42. [http:// www.waynesword.palomar.edu/lmexer5.htm](http://www.waynesword.palomar.edu/lmexer5.htm).
43. [http:// www.wikipedia.lt/antikūnai/antikūnų-tipai](http://www.wikipedia.lt/antikūnai/antikūnų-tipai)
44. International Society for Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens. Table of blood group antigens within systems, December 2005.
45. Young P., Uzieblo A., Trulock E, et al. Autoantibody formation after alloimmunization: are blood transfusion a risk factor for autoimmune haemolytic anemia? *Transfusion*, 2004; 44: 67-72
46. Janeway Ch., Travers P., Walport M., Shlomchik M. *Immunobiology*, 5th edition. Garland Publishing, 2001. P. 72.
47. Janulevičiūtė N. *Imunoglobulinai ir komplimento baltymai: mokomoji priemonė*. Vilnius: VU leidykla, 1994. P. 3-20.
48. Kučinskienė Z. A. *Klinikinės biochemijos ir laboratorinės diagnostikos pagrindai*. Vilnius: VU leidykla, 2008. P. 127-130.
49. Landštainer K., Wiener A. S. An agglutinable factor in human blood recognized by immune system for rhesus blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1940; 43: 223 – 224.
50. Lapierre Y., Rigal D., Adam J. et al. The gel test: a new way to detect red cell antigen- antibody reactions. *Transfusion*, 1990. P109- 113.
51. Lasinskaitė- Čerkašina A., Pavilionis A., Vaičiuvėnas V. *Medicinos mikrobiologija ir virusologijos pagrindai*. Kaunas, 2003. P. 415- 438, 498- 506
52. Lember S. Antikūnai bei antigenai ir reakcijos tarp jų. ABO, Rezus ir kitos kliniškai svarbios kraujo sistemas. *Seminaro medžiaga*. Vilnius, 1999. P. 3-6, 30-44.
53. Lember S. Hemolitinės naujagimių ligos, autoimuninės hemolitinės anemijos, potransfuzinės reakcijos, kraujo grupių ryšis su įvairiomis ligomis. *Seminaro medžiaga*. Vilnius. 1999, P. 5-9

54. Lember S. Komplementinės sistemos vaidmuo imunohematologijoje. Seminaro medžiaga. Vilnius, 2000. P. 16-19
55. Lichtiger B, Surgeon J, Rhorer S. Rh-incompatible platelet transfusion therapy in cancer patients: a study of 30 cases. *Vox Sang* 1983; 45: 139-43.
56. Narvios A. Spontaneous Loss or Reactivation of Atypical RBC Alloantibodies in Cancer Patients. *Current Issues in Transfusion Medicine*. 2002, 10 (3)
57. Neil D., Reid E. The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000, 95(2): 375-387
58. Ramsey G, Hahn LF, Cornell FW, et al. Low rates of Rhesus immunization from Rh-incompatible blood transfusions during liver and heart transplant surgery. *Transplantation* 1989;47: 993-5.
59. Redman M., Regan F., Contreras M. Aprospective study of the incidence of red cell alloimmunisation following transfusion. *Vox Sang*, 1996; 71: 216-220
60. Richard H. Walker. Technical manual. 10th edition. American Association of Blood Banks, 1990. P. 147-150, 211-237
61. Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, et al. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. *Blood* 1990;76: P.1431
62. Schonewille H., Haak H. L., van Zijl A. M. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion*. 1999, 39(7): 763-771.
63. Schonewille H., Leo M. G. van de Watering, Brand A. Additional red blood cell alloantibodies after blood transfusions in a nonhematologic alloimmunized cohort: is it time to take precautionary measures? *Transfusion* 2005; August: P.1-6.
64. Schonewille Henk, Watering Leo M.G., Loomans Dominique S.E., Brand Anneke. Red blood cell alloantibodies after transfusion: factors influencing incidence and specificity. *Transfusion*. 2006, 46(2): 250
65. Sepulveda J. L., Zuckerman K., Talavera F., Marney S., Rice T. D., Kaliner M. A. Alloimmunization From Transfusions. *eMedicine.com, Inc*. 2005. P.1-3
66. Ševčenko J., Žiburt E. Bezopasnoje perelivanije krovi. Sankt- Peterburg. 2000, P. 45-47, 62-71
67. Table of blood group systems. International society of blood Transfusion (October 2006). Retrived on 2006-11-14.

68. Voroneckienė V. Kraujo grupės (pagal eritrocitų antigenų sistemas) : mokomoji knygelė. Vilnius, 2001. P. 4-19, 30-37.
69. Winters JL, Pineda AV, Gordon LD, et al. RBC alloantibody specificity and antigen potency in Olmsted County, Minnesota. *Transfusion* 2001;41: 1413-20.
70. Wsutoday. Test for Rh factor.
71. Zaleckis G. Pagrindinių laboratorinių tyrimų žinynas. Vilnius, 2002. P. 152

Darbo priedai

1 priedas. Aloantikūnų prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, atsiradusių po alogeninių eritrocitų masės transfuzijų tyrimo pradžioje (2004 – 2005 m.), skaičius.

	Aloantikūnai	Transfuzijų skaičius, po kurių atsirado aloantikūnai
1 recipientas	Anti – E	4
2 recipientas	Anti – E	6
3 recipientas	Anti – C	3
	Anti – e	5
4 recipientas	Anti - C ^w	2
5 recipientas	Anti – E	5
6 recipientas	Anti – c	4
	Anti - C ^w	7
7 recipientas	Anti – D	3
8 recipientas	Anti – E	1
	Anti – c	4
	Anti - C ^w	4
9 recipientas	Anti – E	5
10 recipientas	Anti –C	6
11 recipientas	Anti – E	3
	Anti – c	5
	Anti - C ^w	5

2 priedas. Aloantikūnų prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, atsiradusių po alogeninių eritrocitų masės transfuzijų tyrimo pabaigoje (2007 – 2008 m.), skaičius.

	Aloantikūnai	Transfuzijų skaičius, po kurių atsirado aloantikūnai
1 recipientas	Anti-E	11
2 recipientas	Anti-D	2
	Anti-C	3
	Anti – E	3
3 recipientas	Anti-C	8
	Anti-e	9
4 recipientas	Anti-c	2
	Anti-E	3
5 recipientas	Anti-E	2
6 recipientas	Anti-E	2
	Anti-C ^w	5
7 recipientas	Anti-E	3
8 recipientas	Anti-C	6
9 recipientas	Anti-D	2
10 recipientas	Anti-c	6
	Anti- C ^w	7
11 recipientas	Anti-E	3
	Anti-D	8
12 recipientas	Anti-E	2
13 recipientas	Anti-E	3
14 recipientas	Anti-E	3
15 recipientas	Anti-C ^w	4
16 recipientas	Anti-C	11
17 recipientas	Anti-C ^w	8
18 recipientas	Anti-E	7
19 recipientas	Anti-E	5
20 recipientas	Anti - C ^w	3
21 recipientas	Anti – E	2
22 recipientas	Anti – C	5

3 priedas. Autoantikūnų prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus, atsiradusių po hemotransfuzijų, skaičius.

	Autoantikūnai	Transfuzijų skaičius, po kurių atsirado autoantikūnai
1 recipientas	Anti-C ^w	3
2 recipientas	Anti-e	16
3 recipientas	Anti-c	1
	Anti-e	1
4 recipientas	Anti-C	2
5 recipientas	Anti-c	1
6 recipientas	Anti-e	3
	Anti-C ^w	2
7 recipientas	Anti-C	3
8 recipientas	Anti-C ^w	2
	Anti – c	3
9 recipientas	Anti-e	2

4 priedas. Aloantikūnų prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus atsiradimo rizika (aloimunizacijos rizika) (%).

Įvairių tyrimų duomenys	Aloimunizacijos rizika
Mūsų tyrimas	14,77
Schonewille H. (1999 m.)	9,0
Redman M. (1996 m.)	8,4
Fluit C. R. (1990 m.)	11,8
Rosse W. F. (1990 m.)	18,6

5 priedas. Aloantikūnų prieš Rh kraujo grupių sistemos antigenus paplitimas tarp sergančių įvairiomis ligomis pacientų.

Tiriamųjų grupės	Įvairių tyrimų duomenys	Tiriamųjų skaičius (%)		
		Po 1 aloantikūną	Po 2 aloantikūnus	> nei po 2 aloantikūnus
Įvairiomis ligomis sergantys tiriamieji asmenys	Mūsų tyrimas	76,52	15,65	7,83
	Schonewille H. (2005 m.)	85,0	15,0	
	Winters J. (2001 m.)	79,0	18,0	3,8
	Fluit C. R. (1990 m.)	68,19	31,81	

6 priedas. Aloantikūnų prieš Rhesus kraujo grupių antigenus paplitimas.

Aloantikūnai	Aloantikūnų paplitimo dažnis (%) įvairių literatūros šaltinių duomenimis				
	Įvairiomis ligomis sergantys tiriamieji asmenys				
	Mūsų tyrimas	Schonewille H. (2006 m.)	Schonewille H. (2005 m.)	Narvious A. (2002 m.)	Winters J. (2001 m.)
Anti – E	32,75	34,0	29,5	40,9	20,8
Anti – C	17,24	6,3	6,6	4,54	6,8
Anti - C ^w	5,17	-	-	2,27	2,8
Anti – D	41,37	3,03	12,6	4,54	12,9