



# TURINYS

SUTRUMPINIMAI	3
1. ĮVADAS	4
1.1 Darbo tikslas ir uždaviniai	5
2. LITERATŪROS APŽVALGA	
2.1 Kraujo grupių antigenai	6
2.2 Kraujo grupių antikūnai	8
2.2.1 Svarbiausios imunoglobulinų klasės	10
2.3 Antikūnų prieš eritrocitų antigenus tipai	11
2.4 Kliniškai svarbių kraujo grupių antikūnai	12
2.5 Aloantikūnų atsiradimas po hemotransfuzijų	17
2.6 Aloantikūnų išsilaikymas recipientų kraujyje	19
3. EKSPERIMENTINĖ DALIS	
3.1 Tyrimo medžiaga	20
3.1.1 Tiriamosios grupės	20
3.1.2 Tiriamosios medžiagos surinkimas	21
3.2 Tyrimo metodai	21
3.2.1 Antiglobulininio testo (Kumbso reakcijos) principas	21
3.2.2 Antiglobulininio testo atlikimas, panaudojant gelio metodiką	22
3.2.2.1 Reagentų aprašas	24
3.2.2.2 Antikūnų (alo-, auto-) paieška	24
3.2.2.3 Antikūnų identifikavimas	25
3.3 Statistinė duomenų analizė	26
4. DARBO REZULTATAI	26
4.1 Aloantikūnų atsiradimas po hemotransfuzijų	26
4.2 Kliniškai svarbių kraujo grupių aloantikūnų ir autoantikūnų paplitimas	27
4.3 Aloantikūnų išsilaikymas recipientų kraujyje	31
5. REZULTATŲ APTARIMAS	35
6. IŠVADOS	39
SUMMARY	40
LITERATŪROS SĄRAŠAS	42
DARBO PRIEDAS	46

## SUTRUMPINIMAI

AIHA– autoimuninė hemolizinė anemija.

DIK – diseminuota intravaskulinė koaguliacija.

DNR – *deoksiribonukleininė rūgštis* (deoksiribobranduolio rūgštis).

Ig – imunoglobulinas.

MAK – membraną atakuojantis kompleksas.

NHL – naujagimių hemolizinė liga.

Rh– rezus.

ŠAA – šalčio antikūnai.

ŠIA – šilumos antikūnai.

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

## 1. ĮVADAS

Šiuo metu žinoma daugiau kaip 250 eritrocitų kraujo grupių antigenų [11, 21]. 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 [12, 41].

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

Pacientams, kuriems taikoma ilgalaikė hemotransfuzinė terapija, antikūnai prieš kliniškai svarbius kraujo grupių antigenus atsiranda 1- 38 % atvejų [18, 32, 38, 41, 45, 43]. Paprastai antikūnai atsiranda jau po kelių hemotransfuzijų [14, 40].

Pirmasis kontaktas su svetimais kraujo grupių antigenais nesukelia jokių kliniškai reikšmingų pasekmių [12]. 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) [12, 41, 50].

Pacientų, sergančių hematologinėmis ir onkohematologinėmis ligomis, aloantikūnų išsilaikymas kraujyje labai varijuoja. Tai priklauso nuo chemoterapijos, kuri sukelia imunosupresiją, daugybinių kraujo perpylimų bei pačios ligos [44].

## **1.1 Darbo tikslas ir uždaviniai**

### **Darbo tikslas**

Įvertinti ligonių, sergančių hematologinėmis ligomis, antikūnų prieš eritrocitų antigenus atsiradimą, paplitimą ir išsilaikymą po hemotransfuzijų.

### **Uždaviniai**

- 1) įvertinti kliniškai svarbių kraujo grupių aloantikūnų atsiradimą po hemotransfuzijų hematologinių ligonių grupėje.
- 2) įvertinti kliniškai svarbių kraujo grupių aloantikūnų ir autoantikūnų pasiskirstymą.
- 3) įvertinti kliniškai svarbių kraujo grupių aloantikūnų išsilaikymą kraujyje.

## 2. LITERATŪROS APŽVALGA

### 2.1 Kraujo grupių antigenai

Antigenai (gr. anti– prieš, genos– kilmė) tai yra medžiagos, kurios turi savyje svetimos genetinės informacijos požymių ir patekusios (natūraliai ar dirbtinai) į organizmą, sužadina specifines imunines humoralines ar/ ir ląstelines reakcijas [23].

Kraujo grupių antigenai pagal struktūrą yra glikoproteinai, glikolipidai arba struktūriniai baltymai. Jie, būdami eritrocitų membranų struktūrine dalimi, patekę į organizmą kuris neturi šio antigeno, (perpylus netapataus kraujo), gali sukelti imuninį atsaką ir skatinti antikūnų gamybą [1, 3, 23]. Jei antigenas sukelia imuninį atsaką, jis vadinamas imunogenu, o jei prieš antigeną nesigamina antikūnų, toks antigenas vadinamas tolerogenu [23]. Antigeno specifiškumą (sugebėjimą specifiškai sąveikauti su antikūnais) sąlygoja antigeno molekulės veiklioji sritis – antigeninės determinantės (arba epitopai), kurie nekovalentiškai jungiasi su antikūnų aktyviaisiais centrais – paratopais [1, 23].

Eritrocitų membranose serologiškai nustatyta daugiau negu 500 antigenų, dalis kurių 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, kuriuose funkcionuoja 269 įvairūs paveldimi eritrocitų antigenai [11, 45, 21] (1 lentelė).

Sistemos numeris	Sistemos pavadinimas	Sistemos simbolis	Antigenų skaičius	Lokalizacija chromosomoje	Antigeno molekulių funkcijos [16]
001	ABO	ABO	5	q34.2	Šlapalo pernešimas
002	MNS	MNS	44	4q31.21	Anijonų kanalo baltyminiai palydovai
003	P	P1	3	22q11.2–qter	Glikoziltransferazė
004	Rh	RH	56	1p36.11	Struktūriniai baltymai, transportinė funkcija (manoma šlapalo pernešimas)
005	Lutheran	LU	21	19q13.32	Adhezijos receptoriai lamininui
006	Kell	KEL	30	7q34	Metaloproteinazė (Zn-surišanti neutrali endopeptidazė)
007	Lewis	LE	6	19p13.3	alfa(1,3) fukoziltransferazė

008	Duffy	FY	6	1q23.2	Receptoriai: chemokinių, Pl. Vivax
009	Kidd	JK	3	18q12.3	Šlapalo pernešimas
010	Diego	DI	21	17q21.31	Anijonų pernešimas
011	Yt	YT	2	7q22.1	Acetilcholinesterazė
012	Xg	XG	2	Xp22.33	Manoma adhezijos receptoriai
013	Scianna	SC	7	1p34.2	Nežinoma
014	Dombrock	DO	5	12p12.3	ADP- riboziltransferazė
015	Colton	CO	3	7p14.3	Vandens pernešimas
016	Landsteiner- Wiener	LW	7	19p13.2	Adhezijos receptoriai
017	Chido/Rodgers	CH/RG	7	6p21.3	C4 komplemento sistemos komponentas
018	H	H	1	19q13.33	Alfa (1,2) fukoziltransferazė
019	Kx	XK	1	Xp21.1	Manoma neurotransmiterių transportas
020	Gerbich	GE	9	2q14.3	Membranos-citoskeleto vientisumo palaikymas
021	Cromer	CROM	14	1q32.2	Komplemento sistemą reguliuojantys baltymai: imuninių kompleksų pašalinimą greitinantys faktoriai
022	Knops	KN	8	1q32.2	Komplemento sistemą reguliuojantys baltymai: CR1 receptoriaus funkcija
023	Indian	IN	2	11p13	Adhezijos receptoriai
024	Ok	OK	1	19p13.3	Manoma adhezijos molekulės
025	Raph	RAPH	1	11p15.5	Nežinoma
026	John Milton Hagen	JMH	1	15q24.1	Manoma adhezijos receptoriai
027	I	I	1	6p24.2	Šlapalo pernešimas
028	Globoside	GLOB	1	3q26.1	Manoma yra receptoriaus Parvo-B19 virusui ir E. coli [19]
029	Gill	GIL	1	9p13.3	Vandens pernešimas

1 lentelė. Eritrocitų kraujo grupių sistemos, pasiūlytos ISBT [16, 21].

Norint užtikrinti saugią transfuziją būtina nustatyti antikūnus, atsirandančius prieš kliniškai svarbius kraujo grupių antigenus, kurie gali sukelti potransfuzines reakcijas [2]. Pagal literatūroje pateiktus duomenis tokie kliniškai svarbių ir retų kraujo grupių antigenai yra parodyti 2 lentelėje [2, 13, 26, 39, 48].

Sistemos pavadinimas	Svarbiausi antigenai ir jų vidutinis paplitimo dažnis populiacijoje (%)	Hemolizinės potransfuzinės reakcijos
ABO	A (42), A1 (33), B(11), H (67)	įprastos
MNS	M (78), N (72), S (55), s (89)	retos
P	P1 (79)	retos
Rh	D (85), C (70), E (30), c (80), e (98), C <sup>w</sup> (2)	įprastos
Lutheran	Lu <sup>a</sup> (8) Lu <sup>b</sup> (99,9)	retos
Kell	K (8,65), k (99,9) Kp <sup>a</sup> (2), Kp <sup>b</sup> (99,9), Js <sup>a</sup> (1), Js <sup>b</sup> (99,9)	atsitiktinės
Lewis	Le <sup>a</sup> (22), Le <sup>b</sup> (72)	retos
Duffy	Fy <sup>a</sup> (66), Fy <sup>b</sup> (83)	atsitiktinės
Kidd	Jk <sup>a</sup> (77), Jk <sup>b</sup> (72)	atsitiktinės

2 lentelė. Svarbiausi eritrocitų antigenai, jų paplitimas ir sukeliama hemolizinių potransfuzinių reakcijų dažnis [26].

## 2.2 Kraujo grupių antikūnai

Antikūnai (imunoglobulinai) – baltymai, kuriuos sintetina organizmas, reaguodamas į antigeną. Imunoglobulinai tai glikoproteinai, kuriuos sintetina ir sekretuoja plazminės ląstelės [1, 23].

Imunoglobulinų molekulės pagrindinis struktūrinis vienetas yra Y formos monomeras, sudarytas iš 2 porų polipeptidinių grandinių:

- dviejų sunkiųjų grandinių – **H** (angl. *heavy chain*);
- dviejų lengvųjų grandinių – **L** ( angl. *light chain*)

Šios keturios grandinės laikomos vienoje molekulėje nekovalentinėmis ir disulfidinėmis (-S-S-) jungtimis [1, 25]. Imunoglobulinų molekulėje kiekviena polipeptidinė grandinė turi **kintamąjį** regioną (**V**) (angl. *variable*) ir **pastovųjį** (**C**) (angl. *constant*).

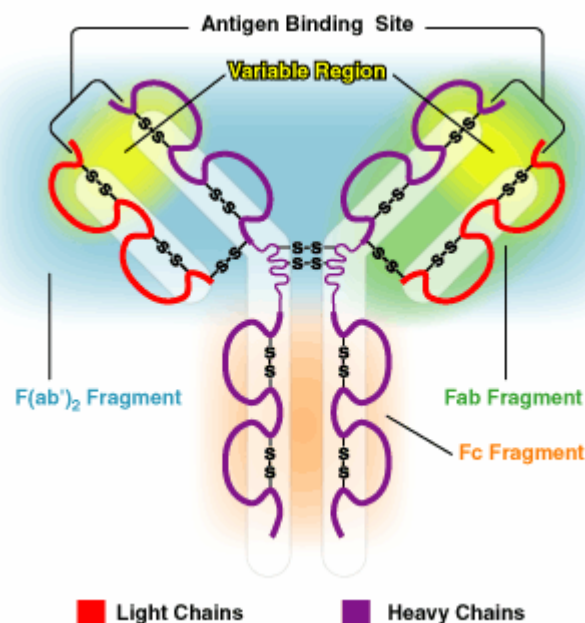


Polipeptidinės grandinės erdvėje suformuoja erdvines struktūras – domenų, kurių kiekvienas apribojamas –S-S- jungtimi.

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, kurie jungiasi su antigenų epitopais [1, 25].

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

- 1) du **Fab** fragmentus (angl. *fragment antigen binding*) turinčius antikūnų aktyvųjį centrą, kuriuo atpažįsta antigeną eritrocitų membranoje ir prisijungia prie jo [1, 23];
- 2) **Fc** fragmentą (angl. *fragment crystallizable*) (1 paveikslas). Šis nereaguoja su antigenu [1], tačiau atlieka kitas svarbias funkcijas:
  - fiksuoja ir aktyvina komplementą (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 makrofago membranose esančio Fc fragmento receptoriaus (FcR), sukeldamas to komplekso, taip pat ir eritrocitų lizę [23].



1 paveikslas. Imunoglobulinų struktūros schema [17].

### 2.2.1 Svarbiausios kraujo grupių imunoglobulinų klasės

Imunohematologijoje svarbiausi IgG ir IgM, mažiau IgA klasių antikūnai. Kliniškai svarbus yra tie antikūnai, kurie su eritrocitų antigenais jungiasi aukštesnioje nei 30°C temperatūroje ir geba aktyvinti komplemento sistemą [48].

**IgM** pirmieji antikūnai, kurie sintetinami, paveikus imunogenui [25]. Tai pentameras (2 paveikslas), kurio molekulinė masė yra 900 000 Da. IgM turi papildomą trumpą polipeptidinę grandinę, vadinama J grandine. Jie sudaro apie 10 % visų kraujo plazmoje esančių imunoglobulinų. Tai „natūraliai“ atsirandantys, šaltieji antikūnai. Kadangi jo molekulėje yra 10 aktyvių jungimosi sričių, jis stipriai jungiasi prie eritrocitų antigenų ir sukelia ryškią agliutinaciją. Dėl didelės molekulinės masės jis nepraeina per placentą, tačiau IgM izotipo antikūnai stipriai aktyvina komplemento sistemą, todėl jiems veikiant kyla didelė intravaskulinių hemolizių grėsmė [25, 26, 48].

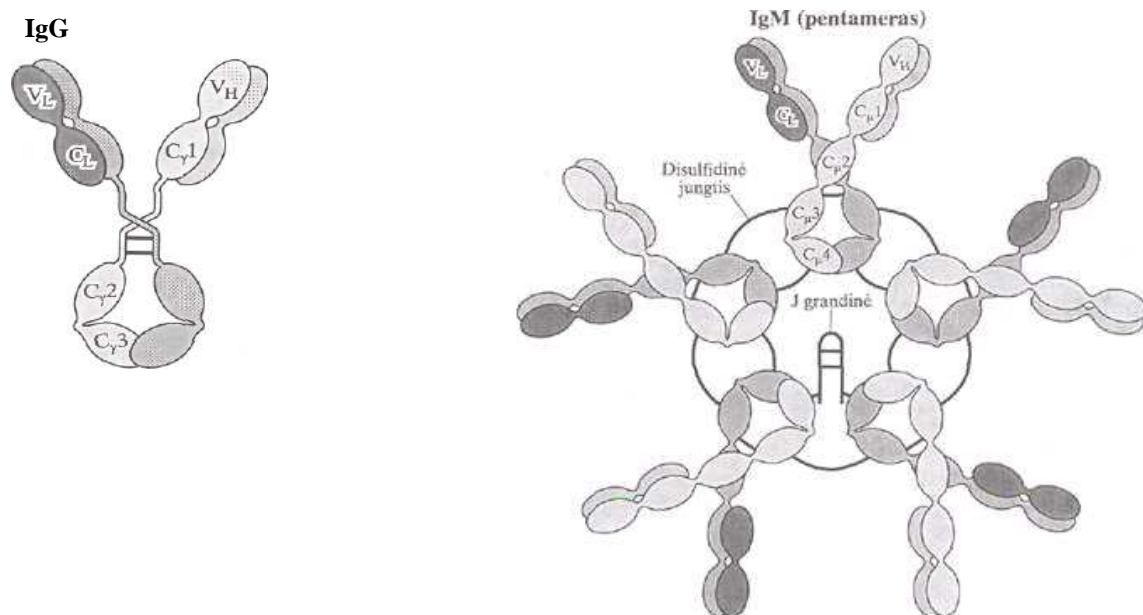
**IgG** imunizavus organizmą, atsiranda vėliau negu IgM (maždaug nuo trečios savaitės). Tai monomerai, kurių molekulinė masė 150 000 Da. Jie sudaro apie 75 % visų kraujo plazmoje esančių imunoglobulinų. Dauguma IgG antikūnų yra „šiltieji“ -su antigenu reaguoja tik 37°C temperatūroje [1, 25, 48].

Yra keli poklasiai, tai IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 [1, 23, 25, 26].

Kliniškai jie yra svarbūs, nes:

- dėl mažos molekulinės masės visi IgG subklasių antikūnai pereina per placentą, t. y. perduodami iš motinos vaisiui [26];
- dauguma autoantikūnų nustatomų autoimuninės hemolizės atvejais, yra IgG antikūnai (daugiausiai **IgG<sub>1</sub>**, rečiau **IgG<sub>3</sub>** poklasio). Šie gali aktyvinti komplemento sistemą klasikiniu keliu [26, 48];
- IgG antikūnai (labiausiai IgG<sub>3</sub>), susiformavus imuniniam kompleksui, pasižymi stipriu polinkiu jungtis prie makrofago FcR receptorių, skatindami imuninių kompleksų fagocitozę, o kartu ir eritrocitų lizę.

**IgA** organizme yra daug, tačiau kraujo plazmoje jis sudaro tik 10-15 % visų imunoglobulinų. Dauguma serume esančių IgA yra monomerai, tačiau gali sudaryti ir multimerus, nes dalis IgA turi J grandinę. Molekulinė masė 180 000- 500 000 Da. Yra žinomi du poklasiai, IgA1 ir IgA2. Daugiausiai jo yra išskiriamų gleivinių paviršiaus, seilių ir ašarų liaukų, žarnyno, bronchų ir kituose sekretuose, kur jis dalyvauja organizmo apsaugoje nuo mikroorganizmų ir virusų [10, 23, 39]. Dėl didelės molekulinės masės jis nepraeina per placentą, tačiau IgA multimerai gali aktyvinti komplemento sistemą klasikiniu keliu [39]. IgA kartais padaugėja sergant autoimuninėm ligom [25, 51].



2 paveikslas. Žmogaus imunoglobulinų G ir M klasių struktūros schema [1].

### 2.3 Antikūnų prieš eritrocitų antigenų tipai

Pagal kilmę antikūnai prieš eritrocitų antigenus gali būti:

- Įgimti arba natūralūs, pavyzdžiui, anti-A ir anti-B
- Įgyti antikūnai, pavyzdžiui, anti- D, anti-E, anti- C, anti- K, anti- Fy<sup>a</sup>, anti- Fy<sup>b</sup> ir kiti.

Pagal antigenų kilmę:

- **aloantikūnai**– yra tokie antikūnai, kurie pasigamina, kai organizmą veikia svetimi jam tos pačios rūšies individo kraujo grupių antigenai, pavyzdžiui, perpylus netapatą pagal ABO sistemą kraujo;
- **autoantikūnai**– tai antikūnai nukreipti prieš savo organizmo eritrocitų antigenus. 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.
- **heteroantikūnai**– antikūnai prieš kitos rūšies eritrocitų antigenus [3, 15, 26, 48].

Pagal temperatūrą prie kurios vyksta antígeno – antikūno imuninės reakcijos:

- **Šaltieji antikūnai** (ŠAA), vadinami pilnieji, su eritrocitų antigenais paprastai reaguoja žemesnioje temperatūroje (4-27°C) [3]. Jie dažnai yra natūralus (natūraliai atsirandantys) IgM klasės antikūnai. *In vitro* ŠAA sukelia matomą agliutinaciją, nes sudaro stabilias jungtis tarp eritrocitų, kadangi vienas antikūno Fab fragmentas jungiasi su antígeno epitopu (veikliąja sritimi) vieno eritrocito paviršiuje, o antras Fab fragmentas jungiasi su analogišku epitopu, esančiu kito eritrocito paviršiuje.
- **Šilumos antikūnai** (ŠIA), vadinami nepilnieji arba neagliutinuojantys, su eritrocitų antigenais paprastai reaguoja aukštesnioje temperatūroje (37 °C) [3, 10, 48]. Jie priklauso IgG<sub>1</sub> arba IgG<sub>3</sub> poklasiui. *In vitro* matomos agliutinacijos nesukelia. Apie 98 % atvejų reaguoja su autologiniais eritrocitų antigenais ir fiksuojasi ant eritrocitų paviršiaus [3, 10]. Kartais ŠIA yra nukreipti prieš specifinį eritrocitų antigeną (dažniau prieš Rh sistemos antigenus) [10].

ŠIA gali aktyvinti komplemento sistemą:

- iki C3b, pavyzdžiui, anti-K antikūnai,
- iki C5b – C9 (MAK), pavyzdžiui, anti-A, anti-B antikūnai [10, 29].

## 2.4 Kliniškai svarbių kraujo grupių antikūnai

Antikūnai prieš kliniškai svarbių kraujo grupių antigenus atsiranda po kraujo perpylimo ar nėštumo [32]. Dauguma jų sukelia lėto ir/arba ūmaus tipo hemolizines potransfuzines reakcijas ir/arba naujagimių hemolizinę ligą (NHL) [29, 34].

Antikūnai reaguodami su eritrocitų antigenais, sudaro imuninius kompleksus, kurie gali aktyvinti komplemento sistemą iki C3 (kai kurie antikūnai aktyvina komplemento sistemą iki MAK susidarymo) [27, 29, 35]. Komplemento fiksacija ant eritrocitų paviršiaus sukelia intravaskulinę hemolizę. Ekstravaskulinė hemolizė išsivysto dėl autoantikūnų, kuriems makrofagai turi specifinius receptorius (FcγR), fiksacijos ant eritrocitų membranos [7, 27, 29, 35].

Remiantis literatūros duomenimis, per paskutinius 10 metų, mažiausiai 9 autoriai paskelbė, kad alogeninių eritrocitų masių transfuzijos sukelia ne tik aloantikūnų, bet ir autoantikūnų, nukreiptų prieš eritrocitų antigenus, gamybą. [15, 22]. Atliktų tyrimų duomenimis, autoantikūnų atsiradimo dažnis po aloimunizacijos hemotransfuzijų metų, siekia 8-25 % [15]. Šie autoantikūnai gali sukelti lėto tipo hemolizines potransfuzines reakcijas ir tapti AIHA atsiradimo priežastimi [15, 16]. Literatūros duomenimis, tokie autoantikūnai, recipientų kraujyje, išsilaiko trumpai. Kai kurie antikūnai prieš eritrocitų antigenus: anti-A, -D, -C, -c, -E,

-e, -Jk<sup>a</sup>, -Jk<sup>b</sup> gali reaguoti su negiminingais svetimais antigenais ir autoantigenais (DNR, tiroglobinu, hemoglobinu, reumatoidiniu faktoriumi). Autoantikūnai po hemotransfuzijų gali atsirasti ir tuomet, kai recipientui perpilamas donoro kraujas, kuriame jau yra aloantikūnų, nukreiptų prie specifinį eritrocitų antigeną. Autoantikūnai pasigamina dėl sąveikos tarp recipiento eritrocitų membranoje esančio antigeno ir donoro aloantikūno [15].

Apie 30 eritrocitų antigenų (Kell, Duffy, MNS, Diego kraujo grupių sistemų) turi reikšmės NHL atsirasti. NHL - tai vaisiaus ir naujagimio eritrocitų hemolizė (irimas). Ji atsiranda, kai nesutampa motinos ir jos vaisiaus eritrocitų antigenai. Svarbiausia priežastis–netapatūs motinos ir vaisiaus Rh ar ABO kraujo grupių antigenai [26, 33].

### Antikūnai prieš Rh sistemos antigenus

Antikūnai prieš šios sistemos antigenus atsiranda po kraujo perpylimo ar neštumo [32]. Anti-E ir anti-C<sup>w</sup> antikūnai gali atsirasti natūraliai, be žinomos stimuliacijos [39]. Šios sistemos antikūnai daugiausiai priklauso IgG1 ir/arba IgG3 poklasiui ir dažniausiai yra šiltieji (su antigenu reaguoja 37°C). Antikūnai anti-E, anti-e ir anti-C<sup>w</sup> gali būti ir IgM klasės [26]. Antikūnai prieš Rh sistemos antigenus sąveikaudami su antigenu retai aktyvina komplemento sistemą [26, 39]. Aloantikūnai prieš šios kraujo grupių sistemos antigenus lengvai atsiranda žmonėms, kurių fenotipas yra– (Rh<sub>null</sub>, D– –) [33]. Dauguma autoantikūnų– šiltieji, IgG klasės, yra specifiški Rh sistemos antigenams, ypač e antigenui [16].

Visi antikūnai prieš Rh sistemos antigenus sukelia NHL. Hemolizė sukelta šių antikūnų vyksta ekstravaskuliariai [28, 33].

- D antigenas yra stipriausias imunogenas, todėl antikūnai prieš šį antigeną (**anti-D**) yra kliniškai ypač svarbūs. Jie dažniausiai atsiranda po hemotransfuzijų ir gali būti NHL priežastimi. Dažnai veikia kartu su anti-C ar anti-E antikūnais.
- **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 ar anti-c. Kraujo serume anti-C dažnai randamas su **anti-C<sup>w</sup>**. D(+) asmenims retai atsiranda anti-C [6, 26].
- **Anti-c** antikūnai po hemotransfuzijų atsiranda retai, nes c antigenas yra silpnas imunogenas. Tačiau šie antikūnai dažnai veikia kartu su **anti-E** antikūnais, sukeldami lėto tipo hemolizines potransfuzines reakcijas ir NHL [26, 28, 39].
- **Anti-e** antikūnai dažniau sutinkami kaip autoantikūnai. Kaip aloantikūnai pasitaiko retai, nes tik 98 % populiacijos turi šį antigeną. Anti-e aloantikūnai veikia kartu su anti-C. [26].

- **Anti-E** antikūnai gali sukelti NHL [28]. Jų klinikinė reikšmė abejotina. Anti-E dažnai veikia kartu su anti-c. Anti-c yra sunkiai identifikuojami esant kartu ir anti-E [6, 39]. Todėl įpylus E- c+ kraujo, gali sukelti hemolizines potransfuzines reakcijas [39].
- **Anti-C<sup>w</sup>** antikūnai po hemotransfuzijų ir nėštumo atsiranda retai, nes C<sup>w</sup> antigenų paplitimo dažnis populiacijoje yra 1- 2 %. Anti-C<sup>w</sup> antikūnai yra specifiški tik C<sup>w</sup> antigenui, su C antigenu nereaguoja [26]. Literatūros duomenimis anti-C<sup>w</sup> antikūnai sukelia ūmią NHL ir hemolizines potransfuzines reakcijas [6, 8].

#### Antikūnai prieš Kell sistemos antigenus

Antikūnai prieš šios sistemos antigenus atsiranda po hemotransfuzijų ar nėštumo [5, 26]. Kell sistemos antigenams būdingas stiprus imunogeniškumas, todėl sukeliamos NHL ir hemolizinės potransfuzinės reakcijos yra labai ryškios [39].

Antikūnai prieš Kell sistemos antigenus priklauso IgG1 ar IgG3 poklasiams, išskyrus anti-K, kurie gali būti natūralūs IgM klasės. Jie dažnai sutinkami kartu su antikūnais prieš Lutheran sistemos antigenus [26].

- **Anti-K ir anti-k** antikūnai gali aktyvinti komplemento kaskadą iki C3b, sukelti lėto ar ūmaus tipo hemolizines potransfuzines reakcijas [26, 32] ir vidutinio sunkumo NHL [5, 28]. Retai sutinkami, kaip autoantikūnai. K antigenas yra stiprus imunogenas, todėl anti-K antikūnai yra dažnai sutinkami [34].
- Kiti antikūnai prieš Kell sistemos antigenus irgi sukelia potransfuzinės reakcijas ir NHL, tačiau, dėl didelio šių antigenų paplitimo populiacijoje (Kp<sup>b</sup> ir Js<sup>b</sup> – 99,9 %), labai mažas žmonių skaičius linkę imunizuotis. Dėl mažo Kp<sup>a</sup>, Js<sup>a</sup> antigenų paplitimo populiacijoje (1-2 %), **anti-Kp<sup>a</sup>** ir **anti-Js<sup>a</sup>** antikūnai pasitaiko labai retai [5, 26, 39].

#### Antikūnai prieš Duffy sistemos antigenus

Antikūnai prieš šios sistemos antigenus paprastai atsiranda po hemotransfuzijų, rečiau po nėštumo [26]. Jie yra kliniškai svarbūs, nes aktyvuoja komplemento sistemą [29] ir todėl sukelia ūmaus ir lėto tipo hemolizines potransfuzines reakcijas [5, 39]. NHL atsiradimas priklauso nuo antikūnų titro [39].

- **Anti-Fy<sup>a</sup>** antikūnai dažniausiai priklauso IgG1 poklasiui, tačiau gali būti ir natūralūs IgM klasės antikūnai.
- **Anti-Fy<sup>b</sup>** antikūnai priklauso IgG1 poklasiui ir dažniau nei anti-Fy<sup>a</sup> sukelia NHL [26].

### Antikūnai prieš Kidd sistemos antigenus

Antikūnai prieš Kidd kraujo grupių sistemos antigenus atsiranda po hemotransfuzijų ar nėštumo. Priklauso IgG1 ir IgG3 poklasiams ir dažniausiai veikia kartu su kitais antikūnais [26].

**Anti-Jk<sup>a</sup>** ir **anti-Jk<sup>b</sup>** aktyvina komplemento sistemą, todėl gali sukelti ūmią intravaskulinę hemolizę, DIK sindromą ir ūmų inkstų nepakankamumą [48]. Apie 30- 60 % atvejų sukelia lėto tipo hemolizines potransfuzines reakcijas [42].

Anti-Jk<sup>a</sup> retai sukelia vidutinio sunkumo NHL [26, 34, 39]. Anti-Jk<sup>b</sup> antikūnai NHL nesukelia [26].

Antikūnai prieš Kidd kraujo grupių sistemos antigenus kraujyje išsilaiko trumpiau už antikūnus prieš kitų kraujo grupių sistemų antigenus. Tačiau po kontakto su jais, žmogaus organizme susiformuoja atminties ląstelės, kurios, kito kraujo perpylimo metu, lemia stiprų imuninį atsaką į antigenus, tai gali būti stiprių potransfuzinių reakcijų priežastis [32, 42, 44, 48].

### Antikūnai prieš MNS sistemos antigenus

Antikūnai prieš MNS sistemos antigenus atsiranda po hemotransfuzijų ar nėštumo (retai anti-M ir anti-N, nes M ir N antigenai yra silpni imunogenai) [26].

Antikūnai prieš MNS sistemos antigenus būna tiek IgG, tiek IgM klasės, išskyrus anti-N, kurie yra šaltieji IgM klasės. Kliniškai labiau svarbūs antikūnai prieš MNS sistemos antigenus, jei jie yra šiltieji (IgG klasės antikūnai) [26]. Anti-M ir rečiau anti-N sukeliama potransfuzinių reakcijų dažnis priklauso nuo antikūnų titro [5].

- **Anti-M** antikūnai retai sukelia lėto tipo potransfuzines reakcijas ir NHL.
- **Anti-N** antikūnai retai sukelia hemolizę, tačiau yra hemoliziškai aktyvūs tų asmenų, kurių fenotipas S-, s- [39].
- Kliniškai labiau svarbūs yra **anti-S** ir **anti-s** antikūnai, nes sukelia ūmaus ir lėto tipo potransfuzines reakcijas ir NHL (nuo vidutinių iki sunkių) [26, 34, 39]. Anti-s antikūnai randami rečiau nei anti-S, nes s antigenai labiau yra paplitę populiacijoje ir yra silpnesni imunogenai nei S antigenai [5, 39].

### Antikūnai prieš Lewis sistemos antigenus

Antikūnai prieš Lewis sistemos antigenus (**anti-Le<sup>a</sup>**, **anti-Le<sup>b</sup>**) po hemotransfuzijų atsiranda retai, tik asmenims, kurių fenotipas yra Le (a-b-) [5, 26, 47]. Paprastai jie yra natūralūs, šaltieji IgM klasės antikūnai. Kliniškai svarbūs anti-Le<sup>a</sup> antikūnai, jei yra šiltieji, IgG

klasės. Jie aktyvuoja komplemento sistemą, sukeldami hemolizę *in vitro*, tačiau nepaprastai retai- *in vivo* [5]. Anti-Le<sup>a</sup> ir anti-Le<sup>b</sup> antikūnus gali neutralizuoti donoro kraujo plazmoje esančios tirpios Le<sup>a</sup> ir Le<sup>b</sup> substancijos [29, 47]. NHL nesukelia, nes vaisiaus eritrocitai Lewis antigenų dar neturi arba jie yra ypač silpni [5, 26, 47].

#### Antikūnai prieš P sistemos antigenus

Antikūnai prieš P sistemos antigenus atsiranda retai po hemotransfuzijų ar nėštumo. **Anti-P<sup>1</sup>** beveik visada yra šaltieji, IgM klasės antikūnai. Jie nesukelia NHL, nes šie vaisiaus eritrocitų antigenai yra silpnai išreikšti. Kliniškai svarbūs anti-P<sup>1</sup> antikūnai, jei yra aktyvūs 37°C. Jie aktyvina komplemento sistemą ir sukelia lėto tipo potransfuzines reakcijas. Auto-anti-P antikūnai sukelia stiprią hemolizę organizme, ypač sergant paroksizmine šalčio hemoglobinurija. Anti- P<sub>1</sub> antikūnai kartu su anti-P ir anti-P<sup>k</sup> (arba anti-Tja) aktyvina komplemento sistemą ir pasižymi ryškiu hemoliziniu aktyvumu *in vitro* ir *in vivo*, tačiau dėl nedidelio antigeno paplitimo nustatomi labai retai [5, 26, 29].

#### Antikūnai prieš Lutheran sistemos antigenus

Antikūnai prieš Lutheran sistemos antigenus (anti-Lu<sup>a</sup>, anti-Lu<sup>b</sup>) paprastai atsiranda po kraujo perpylimo, nėštumo. Anti-Lu<sup>a</sup> kartais atsiranda natūraliai, be išankstinės stimuliacijos antigenais [5]. Jie gali būti IgG, IgM arba IgA klasės.

**Anti-Lu<sup>a</sup>** dažniausiai yra natūralūs, šaltieji IgM klasės antikūnai. Kliniškai svarbūs anti-Lu<sup>a</sup> antikūnai, jei yra šiltieji, IgG klasės, kurie gali sukelti vidutinio sunkumo potransfuzines reakcijas ir NHL. Tačiau vaisiaus eritrocitų Lu<sup>a</sup> antigenai yra silpnai susiformavę, todėl NHL nesukelia arba sukelia labai retai [5, 26, 47].

**Anti-Lu<sup>b</sup>** gali būti IgG, IgM arba IgA klasės antikūnai [26, 47] Jie randami retai, dėl didelio Lu<sup>b</sup> antigeno paplitimo populiacijoje (99,9 %) [5, 26]. Anti-Lu<sup>b</sup> antikūnai kliniškai yra labiau svarbūs, nes aktyvina komplemento sistemą, sukelia lėto tipo hemolizines potransfuzines reakcijas ir vidutinio sunkumo NHL [5, 26, 47].



## 2.5 Aloantikūnų atsiradimas po hemotransfuzijų

Aloantikūnų atsiradimas po hemotransfuzijų priklauso nuo:

- Lyties (nėštumų skaičius)
- Amžiaus
- Transfuzijų skaičiaus anamnezėje.

Nemažą reikšmę aloantikūnų susiformavimui turi ir kiti faktoriai: recipiento imuninės sistemos būklė, ligos, kai kuriais atvejais vartojami medikamentai (imunosupresantai) [12].

Po kraujo perpilimo, nėštumo arba po audinių transplantacijos į organizmą patenka eritrocitų membranoje esantys antigenai, kurie gali sukelti specifinių aloantikūnų gamybą [42, 44]. 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 [41, 44].

Imunogeniškumas yra apibūdinamas kaip tam tikro antigeno sugebėjimas organizme inicijuoti antikūnų gamybą. Pavyzdžiui, D antigenas yra laikomas stipriausiu imunogenu. Recipientui neturinčiam šio antigeno, perpylus Rh D teigiamo kraujo, anti-D antikūnai pasigamins 80 % atvejų [3, 4, 30, 36, 48]. Woodrow ir Donahue apskaičiavo, kad įpylus tik 0,1 ml. Rh(D)+ teigiamo kraujo, recipientui neturinčiam šio antigeno, gali pasigaminti antikūnai anti-D [41]. Tačiau ligoniams, kurių imuninė sistema yra nuslopinta, šis dažnis yra žymiai mažesnis [4, 30, 36, 43].

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:  $K (0,05) > c (0,0205) > E (0,0169) > Fy^a (0,0023) > Jk^a (0,0007)$ . Schonewille H. apskaičiavo kai kurių eritrocitų antigenų imunogeniškumą ir jį taip pat lygino su K antigenu. Pasirodė, kad K antigenas yra 1,3 kartus stipresnis imunogenas nei E, 3,5 kartų - nei  $Jk^a$ , 4,9 kartų – nei c antigenas ir 11,6 kartų – nei  $Fy^a$  [44].

Atskirų literatūros šaltinių duomenimis, pacientams, kuriems taikoma ilgalaikė hemotransfuzinė terapija, antikūnai prieš kliniškai svarbių kraujo grupių antigenus atsiranda 1-38 % atvejų [18, 32, 38, 41, 43, 45]. Kitų autorių teigimų, pacientams, kuriems nuolat atliekamos hemotransfuzijos (sergantiems onkohematologinėmis ligomis, inkstų funkcijos nepakankamumu, transplantuotų organų pacientams) aloimunizacijos dažnis siekia 60 %. Tokiems recipientams keturis kartus dažniau atsiranda ne vienas, o keletas ar daugiau antikūnų [14, 38, 41, 43]. Dar kiti autoriai nurodo, kad dažniausiai aloimunizacija įvyksta po kelių pirmųjų hemotransfuzijų [14, 40].

Kelių autorių vertinimu, asmenims, sergantiems onkohematologinėmis ligomis ir gaunantiems chemoterapinį gydymą, tikimybė atsirasti aloantikūnams yra maža, todėl retos ir potransfuzinės reakcijos [41]. Literatūros duomenimis, pacientams, sergantiems onkohematologinėmis ir onkologinėmis ligomis, aloantikūnai prieš eritrocitų antigenus atsiranda žymiai rečiau, nei sergantiems kitomis (vidaus, chirurginės) ligomis [41, 43]. Pažymėtina, kad, pacientams, kuriems, kartu su chemoterapinio gydymo kursu buvo paskirtos ir trombocitų masės transfuzijos, aloantikūnai prieš eritrocitų antigenus atsiranda rečiau [41].

Schonewille H. ir kitų atliktos analizės parodė, kad 16,8 % antikūnų randama mažiau nei po 14 dienų, iš kurių 0,3- 0,4 % atsiranda per pirmąsias 3 dienas, o 83,2 %- praėjus 14 ir daugiau dienų po hemotransfuzijos. Dažniausiai per trumpą laikotarpį atsiranda antikūnai prieš Kidd kraujo grupių sistemos antigenus – anti-Jk<sup>a</sup> ir anti-Jk<sup>b</sup>, tuo tarpu anti-K ir anti-Fy<sup>a</sup> pasirodo vėliau (po 14 ir daugiau dienų) [44].

Atskirų literatūros šaltinių duomenimis anti-M ir anti-S antikūnų atsiradimas koreliuoja su amžiumi. Anti-M labiau vyrauja jaunų pacientų tarpe [31, 44, 50]. Keli autoriai nurodo, kad antikūnų anti-K ir anti-Jk<sup>a</sup> atsiradimas koreliuoja su transfuzijų skaičiumi [44].

Schonewille H. ir kiti nurodė, kad aloantikūnų atsiradimo rizika (aloimunizacijos rizika) vienos transfuzijos metu lygi 0,2 %, taip pat apskaičiavo aloantikūnų atsiradimo riziką prieš eritrocitų skirtingus antigenus po hemotransfuzijų, ligoniams, sergantiems kitomis, ne onkohematologinėmis ligomis (3 lentelė) [43, 44].

Kraujo grupių sistemų pavadinimai	Eritrocitų antigenai	Aloimunizacijos rizika (%)
Kell	K	9,0
Rh	C	3,6
	E	3,0
	c	2,4
	e	1,9
Kidd	Jk <sup>a</sup>	1,7
	Jk <sup>b</sup>	1,2
Duffy	Fy <sup>a</sup>	1,4
	Fy <sup>b</sup>	0,3
MNS	S	0,6
	M	0,2

3 lentelė. Aloantikūnų prieš eritrocitų antigenus atsiradimo rizika po hemotransfuzijų [43].

## 2.6 Aloantikūnų išsilaikymas recipientų kraujyje

Aloantikūnų, prieš kliniškai svarbių kraujo grupių sistemų antigenus, išsilaikymas recipientų kraujyje varijuoja. Literatūros duomenimis, aloantikūnų išsilaikymui kraujyje įtakos neturi:

- Recipientų amžius ir lytis [37, 42, 44],
- Imunoglobulinų (antikūnų) klasė,
- Atliktų transfuzijų skaičius [42, 44],
- Keleto antikūnų buvimas vienu metu [37].

Keli autoriai nurodė, kad laikas, kurį aloantikūnai išsilaiko recipientų kraujyje yra susijęs su antigeno specifiškumu ir antigeniniu stiprumu [41, 44]. Remiantis kelių literatūros šaltinių duomenimis, vidutinis aloantikūnų išsilaikymas recipientų kraujyje yra parodytas 4 lentelėje [42, 44].

Kraujo grupių sistemos pavadinimai	Aloantikūnai	Vidutinis aloantikūnų išsilaikymas kraujyje (mėnesiais)
Rh	Anti-D	58
	Anti-C	18
	Anti-E	20
	Anti-c	13
	Anti-e	39
Kell	Anti-K	25
Kidd	Anti-Jk <sup>a</sup>	10
	Anti-Jk <sup>b</sup>	9
MNS	Anti-S	45
Duffy	Anti-Fy <sup>a</sup>	24

4 lentelė. Aloantikūnų prieš kliniškai svarbių kraujo grupių sistemų antigenus išsilaikymas kraujyje (mėnesiais) [42, 44]

Pacientų, sergančių hematologinėmis ir onkohematologinėmis ligomis, aloantikūnų išsilaikymas kraujyje labai varijuoja. Galima tuo priežastis– chemoterapinio gydymo sukeliama imunosupresija, daugybiniai kraujo perpylimai ar pačios ligos [42, 44].

### 3. EKSPERIMENTINĖ DALIS

#### 3.1 Tyrimo medžiaga

##### 3.1.1 Tiriamosios grupės

Tiriamasis darbas buvo atliekamas Vilniaus universitetinės ligoninės Santariškių klinikų Laboratorinė diagnostikos centro Kraujo perpylimo laboratorijoje.

Tyrimų objektas– veninis kraujas be konservanto. Ėminiai buvo renkami Vilniaus universitetinės ligoninės Santariškių klinikų hematologijos skyriaus ligoniams. Šie ligoniai buvo tirti todėl, kad šiame skyriuje atliekama daugiausiai hemotransfuzijų per metus– 10322, todėl buvo tikimasi surasti antikūnus.

Buvo ištirtas 674 recipientų kraujas, sergančių hematologinėmis ir onkohematologinėmis ligomis. Tiriamųjų amžiaus grupės ribos buvo nuo 18 iki 82 metų. Visiems tiriamiesiems buvo atlikta nuo 2- 62 suderintų arba mažiausiai nesuderintų eritrocitų masės transfuzijos.

Aloantikūnų atsiradimas po hemotransfuzijų ir antikūnų pasiskirstymas buvo analizuojami 2 metų laikotarpyje (2004- 2005 m.). Aloantikūnų išsilaikymas recipientų kraujyje buvo analizuojamas 5 metų laikotarpyje (2000- 2005 m.).

Susirgimai tarp tiriamųjų, kuriems buvo nustatyti antikūnai, pasiskirstė taip, kaip parodyta 5 lentelėje.

Diagnozė	Ligonių skaičius
Mielodisplastinis sindromas	21
Lėtinė limfocitinė leukemija	21
Ne Hodžkino limfoma	17
Ūmi mieloblastinė leukemija	11
Mielominė liga	10
Lėtinė mielogeninė leukemija	8
Ūmi limfocitinė leukemija	2
Mielofibrozę	3
Eritremija	2
Valdenstromo makroglobulinemija	2
Autoimuninė hemolizinė anemija	12
Geležies stokos anemija	2
Megaloblastinė anemija	1
Viso:	112

5 lentelė. Tiriamųjų, kuriems buvo rasti antikūnai, pasiskirstymas pagal hematologinių ligų grupes.

### 3.1.2 Tiriamosios medžiagos surinkimas

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

## 3.2 Tyrimo metodai

### 3.2.1 Antiglobulininio testo (Kumbso reakcijos) principas

Dar 1945 metais R. Coombsas, A. Mourantas ir R. Race'as aprašė testą, kuriuo nustatomi neagliutinuojantys anti- Rh antikūnai serume [20]. Vėliau šis testas buvo pritaikytas antikūnų ir komplemento komponentų nustatymui, kurie *in vivo* gali padengti eritrocitus [2, 39]. Šiame teste yra naudojami antikūnai prieš žmogaus imunoglobulinus, todėl jis ir buvo pavadintas antiglobulininiu testu arba Kumbso (Coombs) reakcija.

Kumbso reakcija padeda nustatyti vienvalenčius arba nepilnuosius, blokuojančius antikūnus, kurie susidaro esant patologinei būklei, Rh neatitikimui, vykstant autoimuniniam procesui, pasireiškus virusinei, riketsinei, bakterinei infekcijai. Nepilnieji antikūnai gali jungtis su antigenu, tačiau turėdami tik vieną aktyvų centrą, antikūno molekulė prisijungia tik prie vieno antigeno receptoriaus ir nesudaro kompaktiško tinklo, daugiamolekulinių kompleksų. Todėl *in vitro* nesukelia agliutinacijos, precipitacijos ar kitokių fenomenų [25]. Agliutinacijos reakcijai išryškinti ir naudojamas Kumbso reagentas.

Kumbso reagentas – antikūnai prieš IgG Fc fragmentą (jei 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:

- tiesioginė (tiesioginis antiglobulininis testas – DAT (angl. *direct antiglobulin test*)).
- netiesioginė (netiesioginis antiglobulininis testas – IAT (angl. *indirect antiglobulin test*) [39, 48, 51].

**Tiesioginė Kumbso reakcija** (tiesioginis antiglobulininis testas) atliekama, kai yra pagrindo manyti, kad nepilnieji antikūnai ar komplemento komponentai (C3d, C4d) tiriamo individo organizme yra susijungę su eritrocitais [13, 20, 39].

Kumbso reagente esantis anti-IgG Fab fragmentais sujungia dviejų nepilnųjų antikūnų, prisijungusių prie skirtingų eritrocitų molekulių, Fc fragmentus, todėl įvyksta agliutinacija.

**Netiesioginė Kumbso reakcija** (netiesioginis antiglobulininis testas) irgi padeda nustatyti nepilnus antikūnus, tačiau nefiksuotus, o laisvai cirkuliuojančius kraujyje ir kituose organizmo skysčiuose [20, 23, 25, 48]. Šie antikūnai, taip pat kai kurie komplemento komponentai gali reaguoti su eritrocitais *in vivo* [13, 29, 39].

### 3.2.2 Antiglobulininio testo atlikimas, panaudojant gelio metodiką

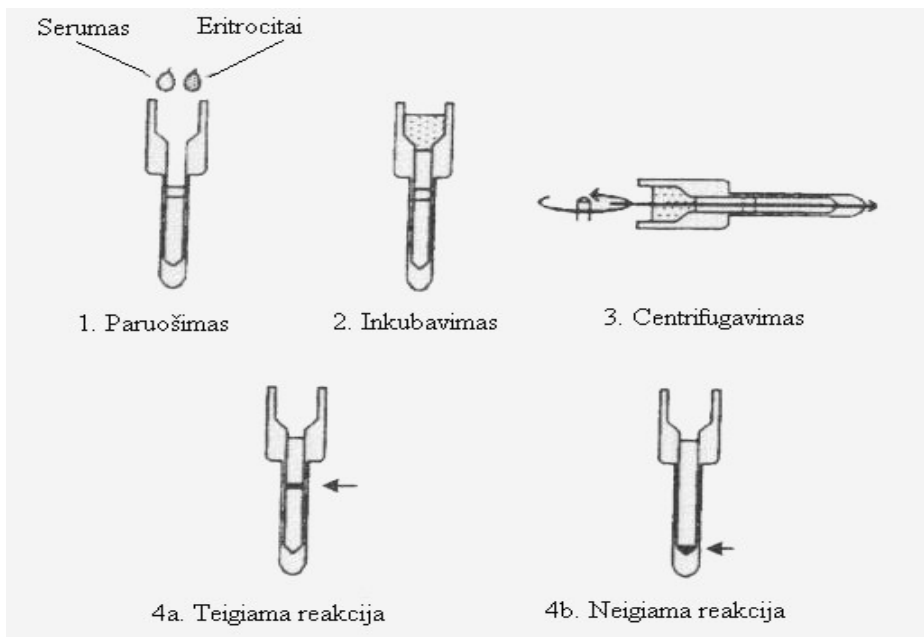
Antikūnų paieška ir identifikavimas buvo atliekami mikromėgintuvėliuose.

Dar 1986 metais Lapiere užpatentavo metodą, kuriame panaudojamos gelio dalelės [23]. Atliekant testavimą gelio metodika, vietoje standartinių mėgintuvėlių naudojami šeši mikromėgintuvėliai patalpinti į plastikinę, taip vadinamą gelio kortelę [2, 9, 13].

Mikromėgintuvėlius užpildo buferinis dekstrino pagrindu pagamintą 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 imunoglobulinus ar komplemento komponentus [46].

Atliekant antiglobulininį testą, į mikromėgintuvėlius pridedama eritrocitų suspensijos ir tiriamo 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 (3 paveikslas) [9, 13].



3 paveikslas: Antiglobulininio testo atlikimas, naudojant gelio metodiką [9].

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 (4 paveikslas) [2, 9, 13].

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.

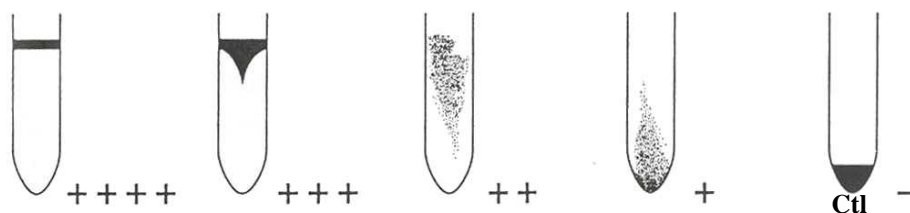
Tyrimų rezultatai gali būti vertinami vizualiai arba specialios kompiuterinės programos pagalba. Rezultatai vertinami taip (4 paveikslas):

**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 [13].



4 paveikslas. Agliutinacijos reakcijos rezultatų vertinimas [13].

### 3.2.2.1 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).

### 3.2.2.2 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- korteles patalpinam 15 minučių į inkubatorių ( $t= 37^{\circ}\text{C}$ ). Vėliau ID- korteles centrifuguojame 10 min 1500 apsisukimų per min. centrifugoje. Vertiname rezultata (nuo– iki 4+).

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

Jei reakcija gauname **teigiamą** (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 [13]. 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 [24].

### **3.2.2.3 Antikūnų identifikavimas**

Naudojame paruoštus ID- Dia Panell 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) [9, 13].

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.

## **3.3 Statistinė duomenų analizė**

Statistinis duomenų apdorojimas atliktas programomis Microsoft Excel, Statistica‘ 99. Duomenys pateikti apskaičiuavus aritmetinį vidurkį ir standartinius nuokrypius.

## 4. DARBO REZULTATAI.

### 4. 1 Aloantikūnų atsiradimas po hemotransfuzijų

Ištyrus 649 recipientų kraują, 88 kraujo mėginiai buvo teigiami pagal tiesioginę ir/ arba netiesioginę Kumbso reakcijas Iš jų 13 (14,77 %) po alogeninių eritrocitų masės transfuzijų atsirado aloantikūnai prieš Rh (68,42 %), Lutheran (15,79 %), Kell (10,53 %), Lewis (5,26 %) ir Kidd (5,26 %) kraujo grupių sistemų antigenus. Aloantikūnų atsiradimas po tam tikro transfuzijų skaičiaus parodytas 6 lentelėje.

Reci-piento Nr.	Aloantikūnai	Transfuzijų skaičius, po kurių atsirado aloantikūnai
1.	Anti-C	3
	Anti-C <sup>w</sup>	60
2.	Anti-E	2
	Anti-C	10
	Anti-Kp <sup>a</sup>	22
3.	Anti-C <sup>w</sup>	6
	Anti-Lu <sup>a</sup>	12
4.	Anti-Lu <sup>a</sup>	11
	Anti-K	16
5.	Anti-C <sup>w</sup>	5
	Anti-D	16
	Anti-E	30
6.	Anti-E, anti-C	2
	Anti-Le <sup>a</sup>	4
7.	Anti-Jk <sup>b</sup>	8
8.	Anti-E	17
9.	Anti-Kp <sup>a</sup>	15
10.	Anti-E	7
11.	Anti-C <sup>w</sup>	5
12.	Anti-Lu <sup>a</sup>	33
13.	Neidentifikuoti	2
	Neidentifikuoti	10

6 lentelė. Aloantikūnų atsiradimas po transfuzijų skaičiaus.

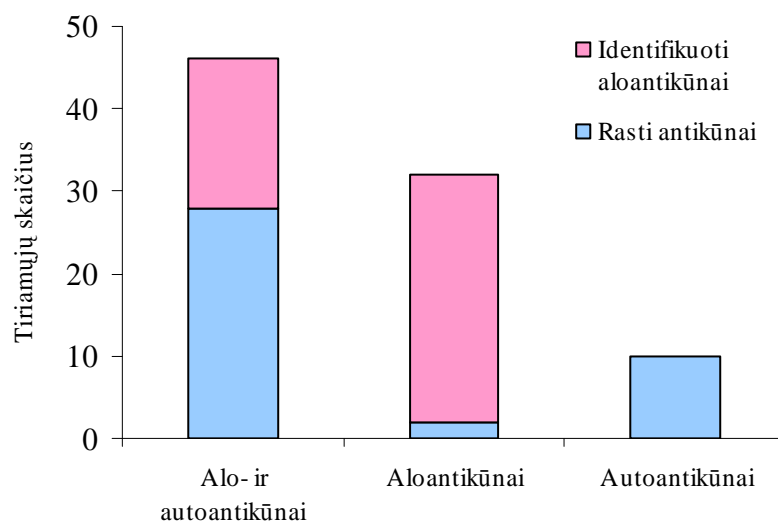
## 4.2 Kliniškai svarbių kraujo grupių aloantikūnų ir autoantikūnų paplitimas

Iš 88 teigiamų, pagal tiesioginę ir/ arba netiesioginę Kumbso reakcijas, kraujo mėginių 32 (36,36 %) nustatyti aloantikūnai, 46 (52,27 %)– alo- ir autoantikūnai ir 10 (11,36 %)– tik autoantikūnai.

Aloantikūnai identifikuoti 48 (54,54 %) pacientams. Autoantikūnų nepavyko identifikuoti nei vienam recipientui (7 lentelė, 5 paveikslas).

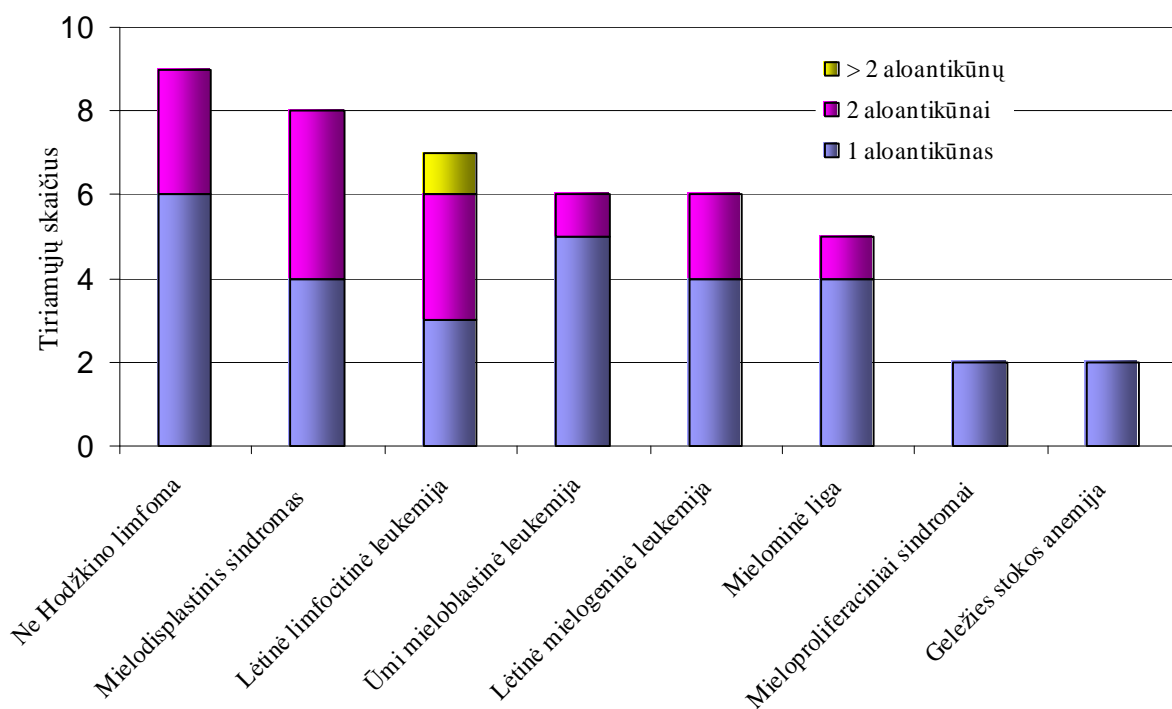
	Recipientų skaičius	
	Rasti antikūnai	Identifikuoti antikūnai
Aloantikūnai	32	30
Alo- ir autoantikūnai	46	18
Autoantikūnai	10	0

7 lentelė. Rasti ir identifikuoti antikūnai.



5 paveikslas. Rastų ir identifikuotų aloantikūnų pasiskirstymas.

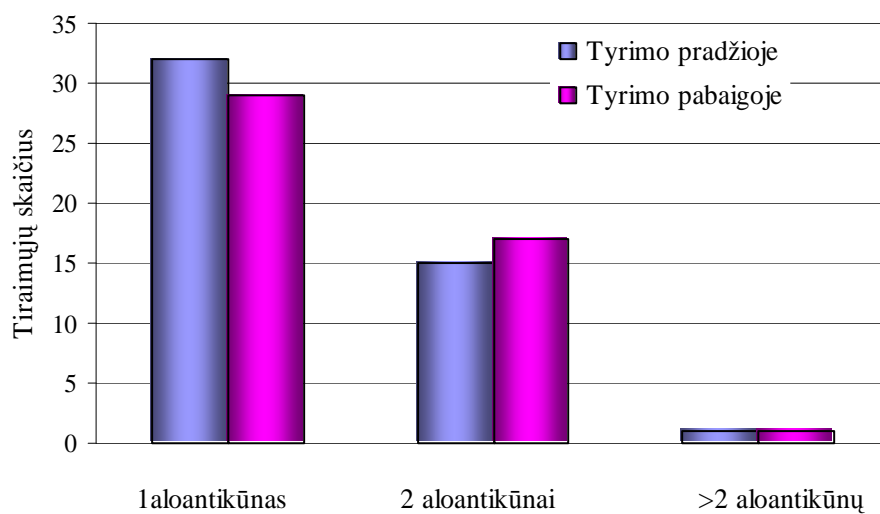
Tyrimo pradžioje po vieną aloantikūną turėjo 65,58 %, po du – 33,33 %, daugiau nei po du aloantikūnus – 2,08 % (6 paveikslas).



6 paveikslas. Įvairiomis hematologinėmis ligomis sergančių tiriamųjų skaičius, kuriems nustatyti aloantikūnai.

Po atliekamų hemotransfuzijų, tyrimo eigoje 8 recipientams (16,67 %) papildomai atsirado 14 aloantikūnų (17,5 %), o 5 recipientams (10,42 %) išnyko 11 aloantikūnų (13,75 %).

Tyrimo pabaigoje po vieną aloantikūną turėjo 62,22 %, po du– 37,5 %, daugiau nei po du aloantikūnus– 4,17 %. Tyrimo pradžioje ir pabaigoje nustatytų aloantikūnų skaičiaus palyginimas pavaizduotas 7 paveiksle



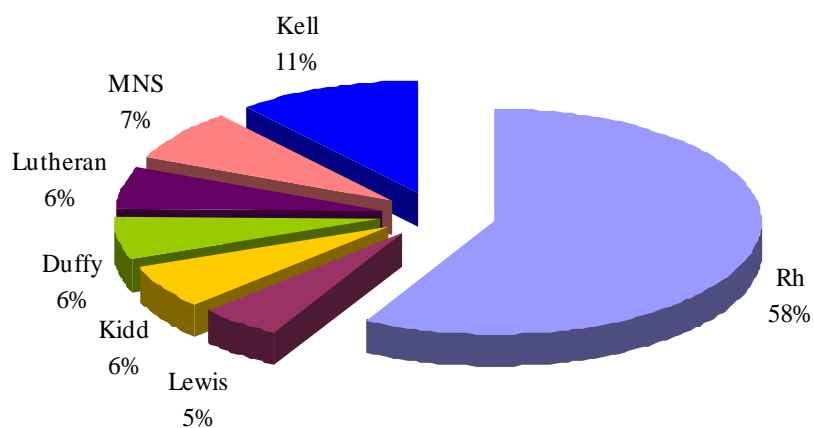
7 paveikslas. Tiriamųjų skaičius, kuriems nustatyti aloantikūnai tyrimo pradžioje ir pabaigoje (2 metų laikotarpyje- 2004-2005 m.).

Išviso buvo identifikuota 81 aloantikūnas 48 tiriamiesiems. Dažniausiai sutinkama aloantikūnų kombinacija buvo C+ C<sup>w</sup> (n=4), D+ C (n=3), E+ c (n=3) (8 lentelė).

Aloantikūnai prieš antigenines struktūras	Aloantikūnų pasiskirstymas tarp tiriamųjų (n= 48)	
	Kraujo grupių sistemos	Eritrocitų antigenai ir jų kombinacijos
Po 1-ą aloantikūną (n=36)	Rh	E (9), D (5), C <sup>w</sup> (4), C (3),
	Kell	K (5), Kp <sup>a</sup> (1),
	MNS	S (3),
	Lutheran	Lu <sup>a</sup> (2), Lu <sup>b</sup> (1),
	Kidd	Jk <sup>a</sup> (1), Jk <sup>b</sup> (1),
	Lewis	Le <sup>b</sup> (1)
Po 2 aloantikūnus (n=22)	Rh	D+ C (3), C+ C <sup>w</sup> (3), C+ e (2), E+ C <sup>w</sup> (2), E+ c (2), C +E (1)
	Rh+ Kell	E+ Kp <sup>a</sup> (1), E+ K (1)
	Rh+ Lutheran	C <sup>w</sup> + Lu <sup>a</sup> (1)
	Rh+ MNS	E+ S (1)
	MNS+ Lewis	S+ Le <sup>a</sup> (1)
	Duffy	Fy <sup>a</sup> + Fy <sup>b</sup> (1)
	Duffy+ Kidd	Fy <sup>a</sup> + Jk <sup>a</sup> (2)
>2 aloantikūnų (n=3)	Rh+ Lewis	E+ c+ Le <sup>a</sup> (1)
	Rh+ Lewis+ MNS	C+ C <sup>w</sup> + Le <sup>b</sup> + S (1)
	Kidd+ Duffy+ Lutheran+ Lewis	Jk <sup>a</sup> +Fy <sup>a</sup> + Lu <sup>a</sup> + Le <sup>a</sup> (1)

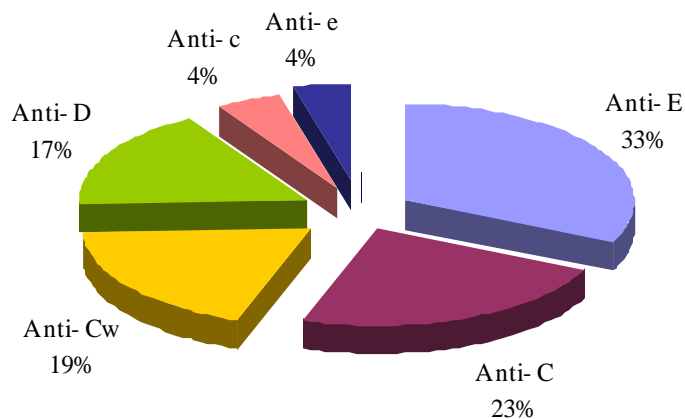
8 lentelė. Aloantikūnų prieš antigenines struktūras paplitimas ir specifiškumas

Analizuojant aloantikūnų prieš kraujo grupių sistemų antigenus paplitimą, nustatėme, kad labiausiai paplitę yra aloantikūnai prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus. Jie sudarė net 58,02 % visų nustatytų aloantikūnų. Mažesnis aloantikūnų paplitimas buvo stebimas prieš Kell kraujo grupių sistemos antigenus (11,11 %). Aloantikūnų prieš visus kitus kraujo grupių sistemų antigenus paplitimas buvo panašus ir sudarė tik 5- 7 % (8 paveikslas).



8 paveikslas. Kliniškai svarbių aloantikūnų paplitimas hematologinėmis ligomis sergančių ligonių grupėje (n=48) 2004 01 – 2006 01 m.

Kadangi didžiausiais aloantikūnų paplitimas buvo stebimas prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus, todėl ją ir analizavome. Nustatėme, kad didžiausiais aloantikūnų paplitimas buvo stebimas prieš E antigeną, o mažiausiais– prieš c ir e antigenus, 4- 8 kartus mažesnis nei kitų aloantikūnų (9 paveikslas).



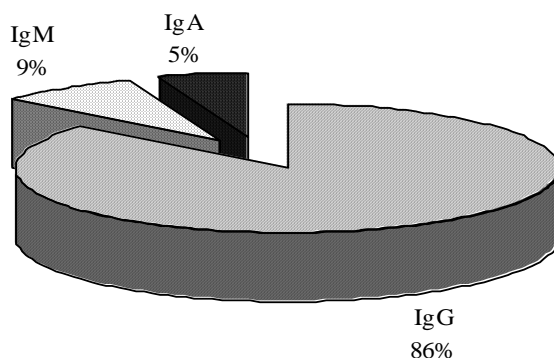
9 paveikslas. Aloantikūnų paplitimas Rh sistemoje hematologinėmis ligomis sergančių ligonių grupėje (n=31) 2004 01 – 2006 01 m.

56 tiriamiesiems, su alo- ir autoantikūnais ir tik su autoantikūnais, tiesioginės Kumbso reakcijos metu buvo nustatyti :

- skirtingų klasių imunoglobulinai:

IgG buvo nustatyti 50/ 56 (89,29%), IgM 5/56 (8,93 %), IgA 3/56 (5,34 %) (10 paveikslas).

- komplemento komponentai C3d nustatyti 27/56 (48,21%), C3c 2/56 (3,57 %).



10 paveikslas. Imunoglobulinų pasiskirstymas pagal klases

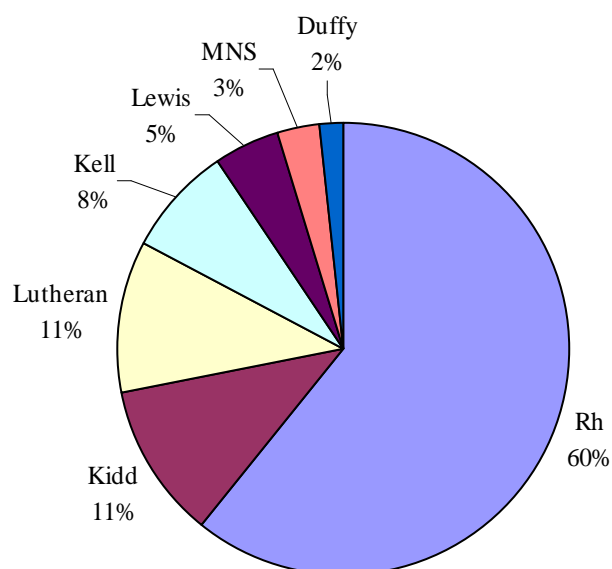
Alo- ir autoantikūnų nepavyko identifikuoti nei vienam recipientui. Šių antikūnų nustatymui reikia atlikti eliuciją ir autologinę arba alogeninę adsorbcijas. Kraujo perpylimo laboratorijoje šiuo metu šie tyrimai neatliekami.

### 4.3 Aloantikūnų išsilaikymas

Siekiant įvertinti aloantikūnų išsilaikymą recipientų kraujyje, buvo atrinkta antra tiriamųjų grupė, nuo 2000 iki 2006 metų, pagal šiuos kriterijus:

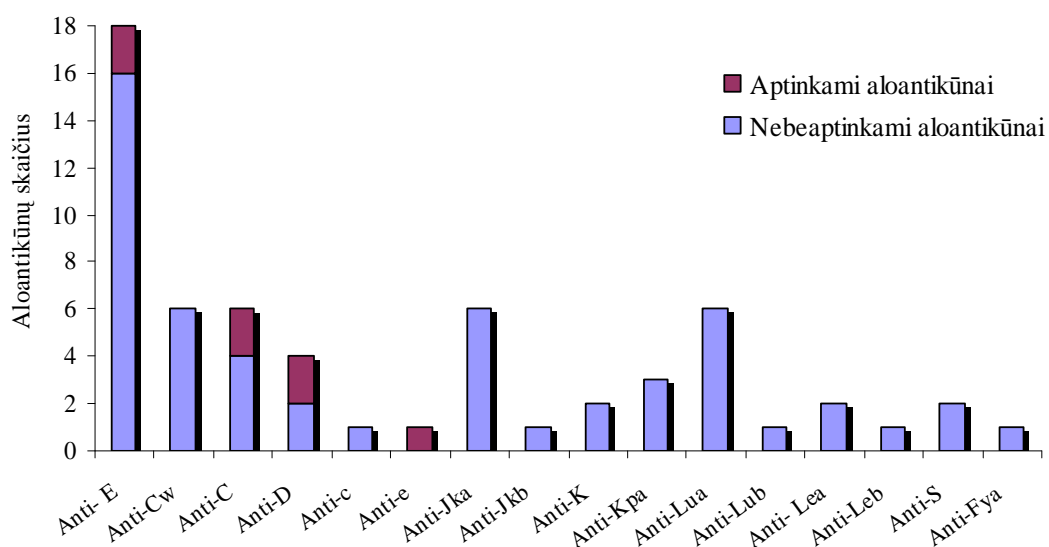
- 1) hematologijos klinikoje besigydyusiems ligoniams buvo rasti ir identifikuoti aloantikūnai,
- 2) antikūnų identifikavimas buvo atliekami kas mėnesį.

Į šią grupę pateko 41 pacientai. Iš viso jiems buvo identifikuoti 63 aloantikūnai prieš skirtingas antigenines struktūras, tarp kurių didžiausią dalį sudarė aloantikūnai prieš Rh sistemos antigenus – 60,32 % (11 paveikslas).



11 paveikslas. Aloantikūnų paplitimas hematologinėmis ligomis sergančių ligonių grupėje (n=41) 5 metų laikotarpyje (2000– 2005 m.).

Analizuojant aloantikūnų išsilaikymą recipientų kraujyje 5 metų laikotarpyje, nustatėme, kad laikui bėgant 56 aloantikūnai (88,89 %) tapo nebeaptinkami. Išnyko visi aloantikūnai prieš  $C^w$ , c,  $Lu^a$ ,  $Lu^b$ ,  $Kp^a$ ,  $Jk^a$ ,  $Jk^b$ ,  $Le^a$ ,  $Le^b$ ,  $Fy^a$ , S, K antigenus, o aloantikūnai prieš E, e, C, D antigenus Rh sistemoje dar buvo aptinkami (12 paveikslas).

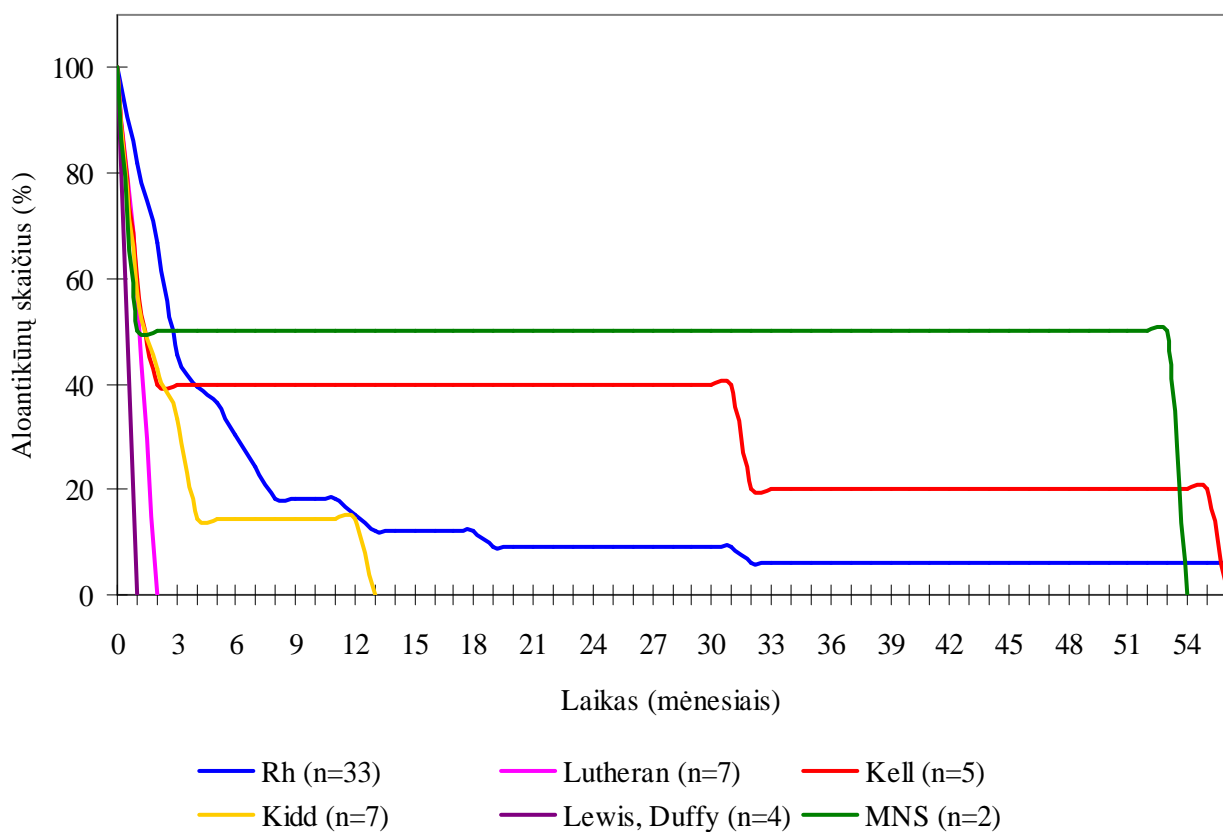


12 paveikslas. Aptinkamų ir nebeaptinkamų aloantikūnų pasiskirstymas 5 metų laikotarpyje.



Analizuojant aloantikūnų išsilaikymą recipientų kraujyje, buvo pastebėta, kad 30,16 % visų nustatytų aloantikūnų jau buvo nebeaptinkami po 1 mėnesio ir 60,32 % po 3 mėnesių.

- Apie 1 mėnesį išsilaikė aloantikūnai prieš– Lewis ( $Le^a$ ,  $Le^b$ ), Duffy ( $Fy^a$ ), Lutheran ( $Lu^b$ ) antigenus,
- apie 2 mėnesius– Lutheran ( $Lu^a$ ), Kell ( $Kp^a$ )
- apie 3 mėnesius– Kidd ( $Jk^b$ ), Rh ( $C^w$ , c),
- apie 4 mėnesius– Kidd ( $Jk^a$ ),
- apie 6 mėnesius– Rh (D),
- apie 10 mėnesių– Rh (E),
- apie 15 mėnesių– Rh (C),
- apie 44 mėnesius– Kell (K),
- apie 51 mėnesį– Rh (e),
- apie 54 mėnesius– MNS (S) (13, 14 paveikslai).

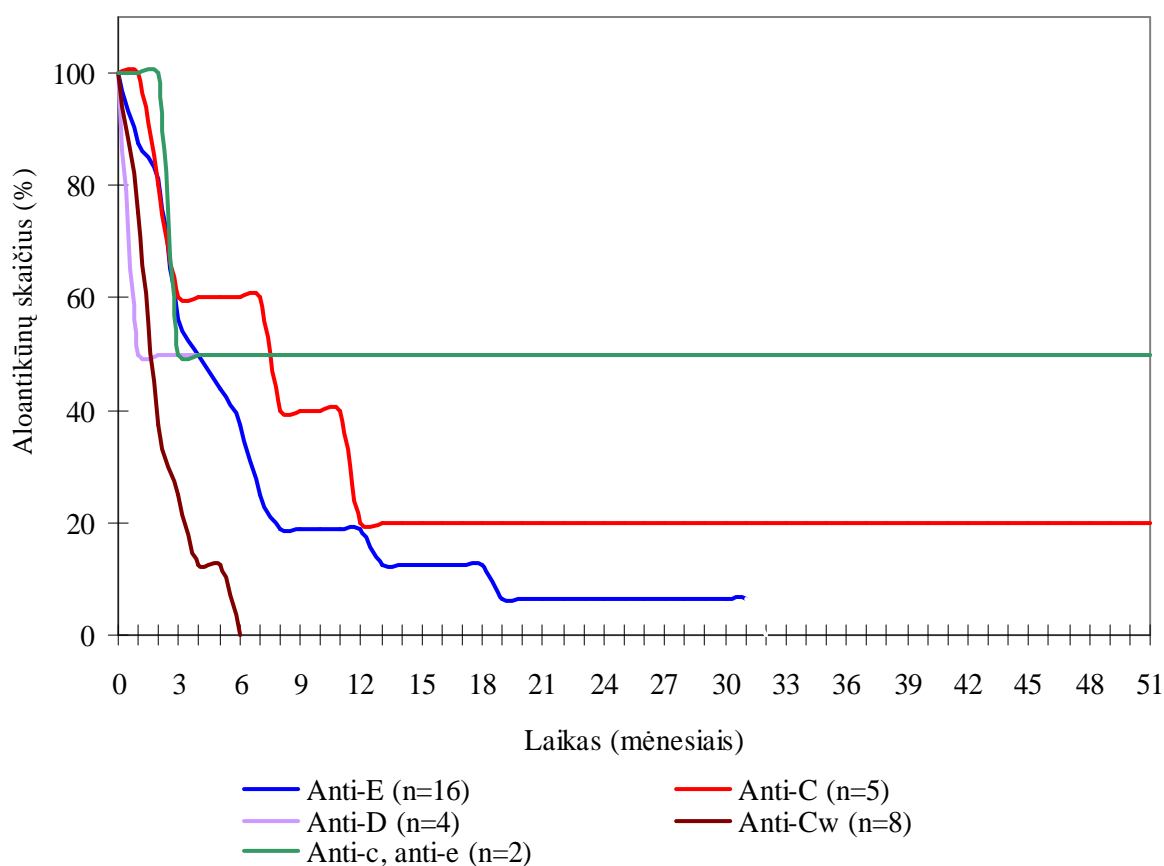


13 paveikslas: Aloantikūnų (n=39) prieš skirtingus kraujo grupių antigenus išsilaikymas recipientų kraujyje.

Kadangi didelę nustatytų aloantikūnų dalį (60,32 %) sudarė aloantikūnai prieš Rh sistemos antigenus (11 paveikslas), todėl detaliau analizavome būtent jų išsilaikymą recipientų kraujyje.

Analizuojant jų išsilaikymą recipientų kraujyje 5 metų laikotarpyje, nustatėme, kad išnyko 81,58 % aloantikūnų, iš jų didžiausia dalis (58,06 %) jau buvo nebeaptinkama po 3 mėnesių.

Trumpiausiai iš visų aloantikūnų Rh sistemoje, išsilaikė aloantikūnai prieš C<sup>w</sup> antigeną – apie 3 mėnesius (2,63±1,69). Po 32 mėnesių išnyko 94,44 % anti-E aloantikūnų, o 30,77 % anti-D, anti-C, anti-e aloantikūnų recipientų kraujyje išsilaikė daugiau nei 51 mėnesį (14 paveikslas).



14 paveikslas. Aloantikūnų prieš Rh kraujo grupės antigenus išsilaikymas recipientų kraujyje.

## 5. REZULTATŲ APTARIMAS

Šiame darbe tyriau antikūnų prieš kraujo grupių antigenus atsiradimą, paplitimą ir išsilaikymą kraujyje. Tiriama grupė– hematologinėmis ir onkohematologinėmis ligomis sergantys pacientai. Šiems ligoniams yra taikoma ilgalaikė hemotransfuzinė terapija, todėl tikėjomes aptikti daugiau antikūnų.

Mano darbo uždavinys buvo– įvertinti kliniškai svarbių kraujo grupių aloantikūnų atsiradimą po hemotransfuzijų. Aloantikūnai po hemotransfuzijų atsiranda, eritrocitų membranoje esantiems antigenams patekus į organizmą, kuris neturi šių antigenų. Nustatėme, kad aloantikūnų atsiradimo rizika (aloimunizacijos rizika) siekė 14,77 %. Mūsų duomenys neprieštaravo kitų tyrėjų duomenims, kur aloimunizacijos rizika siekė 8,4– 18,6 % [14, 38, 40, 41]. Gauti rezultatai atitiko kelių autorių teiginius, kad asmenims, kuriems nuolat atliekamos hemotransfuzijos aloimunizacijos rizika siekia 1– 38 % [32, 45]. Mūsų ir kitų tyrėjų rezultatų palyginamoji lentelė nr. 1 pateikta darbo priede.

Taip pat siekiau įvertinti kliniškai svarbių kraujo grupių aloantikūnų ir autoantikūnų pasiskirstymą. Nustatėme, kad 36,36 % tiriamųjų turėjo aloantikūnus, 52,27 %– alo- ir autoantikūnus, 11,36 %– autoantikūnus. Literatūros šaltiniuose neradau pakankamai duomenų apie aloantikūnų ir autoantikūnų pasiskirstymą hematologinėmis ir onkohematologinėmis ligomis sergančiųjų grupėje. Tik viena tyrėjų grupė, kurie analizavo aloantikūnų paplitimą ir imunogeniškumą kitomis ligomis sergančių ligonių grupėse, nustatė kad 87,6 % tiriamųjų turėjo aloantikūnus, 3,8 %– alo- ir autoantikūnus ir 8,6 %– autoantikūnus [50]. Todėl galima teigti, kad hematologinėmis ir onkohematologinėmis ligomis sergantiems ligoniams aloantikūnų atsiranda mažiau, o autoantikūnų žymiai daugiau. Tai patvirtino Schonewille H. ir kitų teiginiai, kad sergantiems hematologinėmis ir onkologinėmis ligomis, aloantikūnų prieš eritrocitų antigenus atsiranda žymiai rečiau nei sergantiems kitomis ligomis [41, 43]. Autoantikūnų atsiradimą lemia biologiniai, fizikiniai, cheminiai veiksniai (vaistai). Pakitus saviems antigenams, jie tampa imunogenais, todėl prasideda autoantikūnų prieš juos gamyba. Autoantikūnai gali atsirasti kaip sunkios ligos komplikacija, po aloimunizacijos ilgalaikių hemotransfuzijų metu, taip pat perpylus kraujo, kuriame yra aloantikūnų [3, 15, 26, 48].

Norėdami įvertinti antikūnų prieš atskirus eritrocitų antigenus pasiskirstymą, rastus antikūnus identifikavome. Aloantikūnai buvo identifikuoti 54,54 % pacientams. Autoantikūnų nepavyko identifikuoti nei vienam recipientui. 89,29 % tiriamiesiems su alo- ir autoantikūnais ir autoantikūnais buvo nustatyti šiltieji antikūnai, kurie priklausė IgG klasei. Autoantikūnai prieš eritrocitų antigenus dažniausiai yra šiltieji ir priklauso IgG (IgG1 arba IgG3) klasei. Apie 98 %

atvejų fiksuojasi ant eritrocitų paviršiaus, todėl sunku juos identifikuoti. Jie trukdo nustatyti ir aloantikūnus. Norint nustatyti aloantikūnus serume, kuriame yra ŠIA, reikia atlikti eliuciją ir autologinę arba alogeninę adsorbcijas. Kol kas Lietuvoje kraujo perpylimo laboratorijose šie tyrimai neatliekami. Dėl šių priežasčių toliau analizavome tik aloantikūnų pasiskirstymą.

Nustatėme, kad tyrimo pradžioje po vieną aloantikūną turėjo 65,58 %, po du– 33,33 %, daugiau nei po du aloantikūnus– 2,08 % pacientų. Kiti tyrėjai, kurie irgi analizavo antikūnų paplitimą hematologinėmis ir onkohematologinėmis ligomis sergančiųjų grupėje, paskelbė panašius rezultatus. Palyginus mūsų ir kitų tyrėjų rezultatus– skirtumas nereikšmingas: po 1 aloantikūną turėjo 1,1- 2,6 % daugiau jų tiriamųjų, po keletą aloantikūnų– 2,1- 3,6 % mažiau, negu mūsų tiriamųjų [41, 44] (2 lentelė darbo priede). Palyginus mūsų rezultatus su kitų tyrėjų duomenimis, kurie analizavo aloantikūnų paplitimą nehematologinėmis ligomis sergančių ligonių grupėje pastebėjome skirtumą– mūsų tyrimo metu po keletą ir daugiau aloantikūnų nustatyta ~ 2 kartus daugiau, o po 1 aloantikūną – ~1,5 kartų mažiau [43, 50] (2 lentelė darbo priede). Pastebėta tendencija, kad hematologinėmis ligomis sergantiems ligoniams po hemotransfuzijų atsiranda daugiau nei po vieną aloantikūną. Tai galima paaiškinti kelių autorių teigimu, kad pacientams, sergantiems onkohematologinėmis ligomis, kuriems nuolat atliekamos hemotransfuzijos, keturis kartus dažniau atsiranda ne vienas, o keletas ar daugiau antikūnų [14, 38, 41, 43].

Analizuojant aloantikūnų prieš kliniškai svarbių kraujo grupių antigenus, nustatėme, kad dažniausiai sutinkama Rh sistemos aloantikūnų kombinacija buvo C+ C<sup>w</sup>, E+ c, D+C. Panašius rezultatus paskelbė ir kitas autorius: dažniausiai sutinkama aloantikūnų kombinacija buvo D+ C, E+ c, E+ K [41, 43]. Gauti rezultatai atitiko literatūroje pateiktus duomenis, kad anti-E dažnai veikia kartu su anti-c, o anti-C– kartu su anti-D arba anti-C<sup>w</sup> [6, 26, 39].

Siekdami įvertinti aloantikūnų pasiskirstymą, nustatėme, kad labiausiai paplitę buvo aloantikūnai prieš Rh (58,02 %), mažiau Kell (11,11 %) kraujo grupių sistemų antigenus. Keli autoriai paskelbė analogiškus rezultatus [20, 33, 47]. Lyginant aloantikūnų, prieš MNS, Duffy ir Kidd kraujo grupių sistemų antigenus paplitimą, reikšmingo skirtumo taip pat nepastebėjome (1- 5 %) [32, 43, 44, 50]. Aloantikūnų prieš Lutheran sistemos antigenus, nustatėme 10 kartų daugiau, o prieš Lewis– 5 kartus mažiau, nei kiti tyrėjai [50]. Mūsų tyrimo rezultatai neprieštaravo kitų tyrėjų duomenims, kad didžiausiais aloantikūnų paplitimas buvo stebimas prieš E (Rh sistemos) antigeną. Nustatėme, kad labiausiai paplitę aloantikūnai po anti-E, buvo anti-C, anti-C<sup>w</sup> ir anti-D antigenus, tačiau visi kiti autoriai nurodė, kad anti-K. Aloantikūnų prieš K antigeną nustatėme ~2 kartus mažiau [32, 43, 44, 50]. Mūsų ir kitų tyrėjų rezultatų paliginamoji lentelė nr. 4 pateikta darbo priede. Didžiausias aloantikūnų paplitimas buvo

stebimas prieš Rh kraujo grupės sistemos antigenus, nes šie antigenai yra stipriausi imunogenai po ABO kraujo grupės sistemos.

Įvertinome kliniškai svarbių aloantikūnų išsilaikymą recipientų kraujyje. Analizę atlikome 5 metų laikotarpyje. Nustatėme, kad išnyko beveik visi aloantikūnai, išskyrus, aloantikūnus prieš E, e, C ir D antigenus (Rh sistemoje). Gautus rezultatus palyginome su kito tyrėjo duomenimis, kuris irgi įvertino aloantikūnų išsilaikymą tokioje pat tiriamųjų grupėje. Mūsų tyrimo duomenimis, 30,16 % visų nustatytų aloantikūnų išsilaikė apie 1 mėnesį, tačiau kitas tyrėjas nurodė ~2 kartus mažesnę reikšmę. 60,32 % visų nustatytų aloantikūnų išsilaikė apie 3 mėnesius. Panašų rezultatą gavo ir kiti autoriai (54,84 %). Kitas autorius nurodė, kad daugiau nei 12 mėnesių išsilaikė 19,35 % aloantikūnų. Mes gavome 2 kartus mažesnę reikšmę – 9,5 % [41].

Analizuojant aloantikūnų išsilaikymą recipientų kraujyje, nustatėme, kad trumpiausiai išsilaikė aloantikūnai prieš šiuos kraujo grupių sistemų antigenus:

- apie 1 mėnesį išsilaikė– Lewis ( $Le^a$ ,  $Le^b$ ), Duffy ( $Fy^a$ ), Lutheran ( $Lu^b$ );
- apie 2 mėnesius– Lutheran ( $Lu^a$ );
- apie 3 mėnesius– Kidd ( $Jk^b$ ), Rh ( $C^w$ );
- apie 4 mėnesius– Kidd ( $Jk^a$ ).

Ilgiausiai recipientų kraujyje išsilaikė aloantikūnai prieš šiuos kraujo grupių sistemų antigenus:

- apie 44 mėnesius– Kell (K)
- apie 51 mėnesį– Rh (e)
- apie 54 mėnesius– MNS (S)

Lyginant antikūnų prieš Kidd kraujo grupių sistemos antigenus (anti- $Jk^a$ , anti- $Jk^b$ ) išsilaikymą su kito autoriaus duomenimis, mūsų tyrimo metu gauti rezultatai neprieštaravo šio tyrėjo rezultatams [41].

Gautus rezultatus palyginome su kito tyrėjo duomenimis, kuris analizavo aloantikūnų išsilaikymą nehematologinėmis ligomis sergančių ligonių grupėje. Mūsų tyrimo metų nustatyti aloantikūnai prieš D antigeną išsilaikė 10 kartų, E – 2,2 kartų, e – 4,3 kartų, C – 1,2 kartų,  $Fy^a$  – 24 kartus,  $Jk^a$  – 2,6 kartų,  $Jk^b$  – 3 kartus trumpiau. Tačiau aloantikūnai prieš S antigeną išsilaikė 1,2 kartų, e – 1,3 kartų, K – 1,7 kartų ilgiau [42]. Pastebėta tendencija, kad hematologinėmis ir onkohematologinėmis ligomis sergančių ligonių kraujyje aloantikūnai išsilaiko trumpiau, nei kitomis ligomis sergantiems. Šiomis ligomis sergantiems ligoniams aloantikūnų išsilaikymas kraujyje varijuoja. Galima tuo priežastis– chemoterapinio gydymo sukeliama imunosupresija, daugybiniai kraujo perpylimai ar pačios ligos [42, 44].

Išanalizavę šio tyrimo rezultatus, galima teigti, jog pacientams, kuriems ateityje bus taikoma ilgalaikė hemotransfuzinė terapija (sergantiems hematologinėmis ir onkohematologinėmis ligomis), rekomenduotina nustatyti Rh fenotipą ir kitų kliniškai svarbių kraujo grupių sistemų antigenus: Kell, Kidd, Duffy, MNS, tam, kad išvengti aloantikūnų susidarymo. Apie nustatytus aloantikūnus rekomenduojama pažymėti paciento ligos istorijoje.

## 6. IŠVADOS

- 1) Iš 88, hematologinėmis ligomis sergančių, tiriamųjų 14,77 % po alogeninių eritrocitų masės transfuzijų atsirado aloantikūnai prieš Rh (68,42 %), Lutheran (15,79 %), Kell (10,53 %), Lewis (5,26 %) ir Kidd (5,26 %) kraujo grupių sistemų antigenus.
- 2) Aloantikūnai nustatyti 36,36 %, alo- ir autoantikūnai– 52,27 %, autoantikūnai– 11,36 % tiriamųjų. Didžiausias kliniškai svarbių kraujo grupių aloantikūnų paplitimas nustatytas Rh kraujo grupės sistemoje (58,02 %) prieš E antigeną (18,52 %) ir Kell (11,11 %)– prieš K antigeną (8,64 %). Mažesnis aloantikūnų paplitimas nustatytas kitose kraujo grupių sistemose: MNS (7,4 %), Lutheran, Kidd ir Duffy (6,17 %), Lewis (4,9 %).
- 3) Aloantikūnų prieš atskirus kliniškai svarbius kraujo grupių sistemų antigenus išsilaikymas kraujyje skiriasi. Po 1 mėnesio nebeaptinkami 30,16 % visų nustatytų aloantikūnų, po 3–60,32 %, po 5 metų– 88,89 %. Ilgiausiai recipientų kraujyje išsilaiko aloantikūnai prieš K (Kell), S (MNS), e, C, E, D (Rh) antigenus. Trumpai išsilaiko aloantikūnai prieš Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup> (Lewis), Fy<sup>a</sup> (Duffy), Lu<sup>a</sup>, Lu<sup>b</sup> (Lutheran), Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup> (Kidd) antigenus.

## SUMMARY

### **The evaluation of red cell antibodies alloimmunization, incidence and persistence**

A study was performed to investigate the rate of alloimmunization against red blood cell antigens, clinically significant red cell antibodies incidence and persistence.

Blood samples of 674 patients with hematologic and hematooncologic diseases, who undergo transfusion were studied. Antibodies screening and identification were performed by direct and indirect Coombs test.

We examined the alloimmunization risk and antibodies incidence over the period of 2 years. We found, that clinically significant alloantibodies developed in 14,77 % of patients against Rh (68,42 %), Lutheran (15,79 %), Kell (10,53 %), Lewis (5,26 %) and Kidd (5,26 %) blood group systems antigens.

Alloantibodies were found in 36,36 %, allo- and autoantibodies in- 52,27 %, autoantibodies in- 11,36 % patients. The most frequent detected antibodies were anti-E (18,52 %), anti-C (13,58 %) in Rh system and anti-K (8,64 %) in Kell system. Less incidence was found in MNS (7,4 %), Lutheran, Kidd and Duffy (6,17 %), Lewis (4,9 %) blood group systems.

We examine the persistence of red blood cell alloantibodies over a period of 5 years. The persistence of clinically significant antibodies varies among people and among antibodies. After 1 months 30,16 % antibodies become undetectable, after 3 months- 60,32 %, after 5 years- 88,89 %. We found, that  $Le^a$ ,  $Le^b$  (Lewis),  $Fy^a$  (Duffy),  $Lu^a$ ,  $Lu^b$  (Lutheran),  $Jk^a$ ,  $Jk^b$  (Kidd)  $C^w$  (Rh) antibodies are detectable for shortest time (~1-4 months). For a longer time the antibodies: anti-K (Kell), anti-S (MNS), anti-e (Rh) were detectable (44- 54 months).



## PADĖKA

Nuoširdžiai dėkinga VU MF Fiziologijos, biochemijos ir laboratorinės medicinos katedros dr. Loretai Bagdonaitei ir VUSK LDC Kraujo perpylimo 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. 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
4. Asfour M, Narvios A, Lichtiger B. Transfusion of RhD-incompatible blood components in RhD-negative blood marrow transplant recipients. MedGenMed 2004; 6: 22.
5. Austin Community College. Other Blood Group Systems. MLAB 2431. IMMUNOHEMATOLOGY COURSE OUTLINE/OBJECTIVES LECTURE GUIDE. Spring 2005. P.2-7
6. Austin Community College. Rh Blood Group System. MLAB 2431. IMMUNOHEMATOLOGY COURSE OUTLINE/OBJECTIVES LECTURE GUIDE. Spring 2005 P. 1-3
7. Balsys J. Anemijos, 1999. p. 136-139
8. 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
9. 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
10. 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
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. Dettke M., Hocker P. Klinikinė transfuziologija. Gydymas krauju ir jo komponentais. Kraujo grupių serologijos ir transfuziologijos klinika. Viena 2003. P.9, 12, 24
13. DiaMed- ID Micro Typing Systems kompanijos metodiniai nurodymai vartotojui. LR SAM Sprendimas Nr. 2- 128:1994. P. 46- 50
14. Fluit C. R., Kunts V. A., Drenthe- Schonk A. M. Incidence of red cell antibodies after multiple blood transfusion. Transfusion, 1990; 30: 532-535
15. Garratty G., PhD, FRCPath. Autoantibodies induced by blood transfusion. Transfusion, 2004; Vol44, Issue1, P. 5

16. Garratty G., Telen M. J., Petz L. D. Red cell antigens as functional Molecules and obstacles to transfusion. *Hematology*, 2002 (1) P. 445
17. Harlow E., Lane D. Introduction to antibodies. 2nd edition. Chemicon International, Inc. P. 3-4
18. Heddle N. M., Soutar R. L., O'Hoski P. L., et al. A prospective study to determine the frequency and clinical significance of alloimmunization post- transfusion. *British Journal of Haematology*, 1995; 91:1000- 1005
19. Hellberg A., Poole J., Olsson M.L. Molecular Basis of the Globoside-deficient P<sup>k</sup> Blood Group Phenotype. *J. Biol. Chem.*, 2002; Vol. 277, Issue 33: 29455
20. <http://www.itxm.org/Archive/tul-94.htm>
21. International Society for Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens. Table of blood group antigens within systems, December 2005
22. 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
23. Janeway Ch., Travers P., Walport M., Shlomchik M. *Immunobiology*, 5th edition. Garland Publishing, 2001. P. 72
24. 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.
25. Lasinskaitė- Čerkašina A., Pavilionis A., Vaičiuvėnas V. *Medicinos mikrobiologija ir virusologijos pagrindai*. Kaunas, 2003. P. 415- 438, 498- 506
26. Lember S. Antikūnai bei antigenai ir reakcijos tarp jų. ABO, Rezus ir kitos kliniškai svarbios kraujo sistemos. *Seminaro medžiaga*. Vilnius, 1999. P. 3-6, 30-44
27. Lember S. Autoimuninė hemolizinė anemija, tiesioginio antiglobulininio testo tyrimo reikšmė. *Seminaro medžiaga*. Vilnius. 1999, P. 7-9
28. Lember S. Hemolitinės naujagimių ligos, autoimuninės hemolitinės anemijos, potransfuzinės reakcijos, kraujo grupių ryšis su įvairiomis ligomis. *Seminaro medžiaga*. Vilnius. 1999, P. 5-9
29. Lember S. Komplementinės sistemos vaidmuo imunoematologijoje. *Seminaro medžiaga*. Vilnius, 2000. P. 16-19
30. 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.
31. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Other red cell antigens. In: *Blood transfusion in clinical medicine*. 10th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd.; 1997. P. 186-212

32. Narvios A. Spontaneous Loss or Reactivation of Atypical RBC Alloantibodies in Cancer Patients. *Current Issues in Transfusion Medicine*. 2002, 10 (3)
33. Neil D., Reid E. The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000, 95(2): 375-387
34. Packman C. H., Leddy J. P. Acquired hemolytic anemia due to warm- reacting autoantibodies. In: Beutler E., Lichtman M.A., Coller B.S., Kipps T. J. (eds). *Williams' hematology*, 5th ed. New York: McGraw – Hill, 1995. P. 677-685
35. Park T. S., Kim K. U., Jeong W. J., Kim H. H., Chang C. L., Chung J. S., Cho G. J., Lee E. Y., Son H. C. Acute Hemolytic Transfusion Reactions due to Multiple Alloantibodies Including Anti-E, Anti-c and Anti-Jk<sup>b</sup>. *Journal of Korean Medical Sciences*. 2003, 18: 894-896
36. 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.
37. Ramsey G., Larson P. Loss of red cell aloantibodies over time. *Transfusion*, 1988; Vol. 28 (2), P.162
38. Redman M., Regan F., Contreras M. Aprospective study of the incidente of red cell alloimmunisation following transfusion. *Vox Sang*, 1996; 71: 216-220
39. Richard H. Walker. Technical manual. 10th edition. American Association of Blood Banks, 1990. P. 147-150, 211-237
40. Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, et al. Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. *Blood* 1990;76: P.1431
41. 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
42. Schonewille H., Haak H. L., van Zijl A. M. RBC antibody persistence. *Transfusion* 2000; 40:1127- 1131
43. 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
44. 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
45. 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
46. Ševčenko J., Žiburt E. Bezopasnoje perelivanije krovi. Sankt- Peterburg. 2000, P. 45-47, 62-71

47. Vorki A., Commings R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J. Essentials of glycobiology. California. 1999, P.72-73
48. Voroneckienė V. Kraujo grupės (pagal eritrocitų antigenų sistemas) : mokomoji knygelė. Vilnius, 2001. P. 4-19, 30-37
49. Wilkman A., Axdorph U., Gryfelt G., Gustafsson L., Bjoorkholm M., Lundahl J. Characterization of red cell autoantibodies in consecutive DAT-positive patients with relation to in vivo haemolysis. Ann Hematol. 2005, 84: 150-158
50. Winters JL, Pineda AV, Gordon LD, et al. RBC alloantibody specificity and antigen potency in Olmsted County, Minnesota. Transfusion 2001;41: 1413-20.
51. Zaleckis G. Pagrindinių laboratorinių tyrimų žinynas. Vilnius, 2002. P. 152

## DARBO PRIEDAS

### Palyginamosios lentelės

Įvairių tyrimų duomenys	Aloimunizacijos rizika (%)
Mūsų tyrimas	14,77
Shonewille (1999 m.) [41]	9,0
Redman M. (1996 m.) [38]	8,4
Fluit C. R. (1990 m.) [14]	11,8
Rosse W. F.(1990 m.) [40]	18,6

1 lentelė. Aloantikūnų atsiradimo rizika (aloimunizacijos rizika) (%).

Tiriamųjų grupės	Įvairių tyrimų duomenys	Tiriamųjų skaičius (%)		
		Po 1 aloantikūną	Po 2 aloantikūnus	> nei 2 aloantikūnus
Hematologinėmis ir onkohematologinėmis ligomis sergantys ligoniai	Mūsų tyrimas	65,58	33,33	2,08
	Shonewille (1999 m.) [41]	66,67	27,45	5,88
	Fluit C. R. (1990 m.) [14]	68,19	31,81	
Kitomis ligomis sergantys ligoniai	Winters J. (2001m.) [50]	79,0	18,0	3,8
	Shonewille (2005 m.) [43]	85,0	15,0	

2 lentelė. Aloantikūnų paplitimas tarp sergančiųjų hematologinėmis, onkohematologinėmis ir kitomis ligomis.

Aloantikūnai prieš kraujo grupių sistemų antigenus	Paplitimo dažnis (%)				
	Mūsų tyrimo duomenys	Narvious A. (2002m.) [32]	Winters J. (2001m.) [50]	Shonewille (2005 m.) [43]	Shonewille (2006 m.) [44]
Rh sistema	58,02	56,8	38,39	54,6	50,1
Kell sistema	11,11	18,18	12,33	23,1	24,95
MNS sistema	7,41	-	7,55	5,3	4,7
Lutheran sistema	6,17	-	0,65	-	-
Duffy sistema	6,17	2,72	5,29	9,0	9,9
Kidd sistema	6,17	11,36	2,97	8,1	10,4
Lewis sistema	4,94	-	22,19	-	-

3 lentelė. Aloantikūnų paplitimas pagal kraujo grupių sistemas.

Aloantikūnai	Aloantikūnų paplitimo dažnis (%) įvairių literatūros šaltinių duomenimis				
	Hematologinėmis ir onkohematologinėmis ligomis sergantys ligoniai		Kitomis ligomis sergantys ligoniai		
	Mūsų tyrimas	Narvious A. (2002 m.) [32]	Winters J. et al.(2001m.) [50]	Shonewille (2005 m.) [43]	Shonewille (2006 m.) [44]
Anti-E	18,52	40,9	20,8	29,5	34,0
Anti-C	13,58	4,54	6,8	6,6	6,3
Anti-C <sup>w</sup>	11,11	2,27	2,8	-	-
Anti-D	9,88	4,54	12,9	12,6	3,03
Anti-K	8,64	18,18	14,7	23,1	24,9
Anti-S	7,41	-	1,5	2,2	2,3
Anti- Lu <sup>a</sup>	4,94	-	0,8	-	-
Anti-Fya	4,94	2,27	6,3	8,7	9,0
Anti-Jk <sup>a</sup>	4,94	6,81	3,0	6,0	7,9
Anti-c	2,47	4,54	3,5	4,9	8,5

4 lentelė. Aloantikūnų prieš eritrocitų antigenus paplitimas.