



**Središnja medicinska knjižnica**

**Čulić, Srđana (2004) *Serumski citokini u djece i odraslih s akutnom autoimunom trombocitopenijom*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/349>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**Medicinski fakultet  
SVEUČILIŠTA U ZAGREBU**

**Srđana Čulić**

**SERUMSKI CITOKINI U DJECE I  
ODRASLIH S AKUTNOM AUTOIMUNOM  
TROMBOCITOPENIJOM**

**Doktorska disertacija**

**Zagreb, 2004.**

Ova je disertacija ostvarena u Klinici za dječje bolesti KB Split, Centralnom laboratoriju KB Split Križine, Laboratoriju za imunogenetiku KB Split Križine i Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb, Odjel za kliničku mikrobiologiju, Odsjek za serologiju.

**Mentor rada je prof. dr. sc. Boris Labar**

Prof. dr. sc. Borisu Labaru i prof. dr. sc. Ani Marušić zahvaljujem na pomoći u koncepciji i izradi rada.

Najljepša hvala mr. sc. Ilzi Salamunić, dipl. ing. na osiguranju uvjeta za laboratorijska mjerenja.

Mnogo hvala osoblju Laboratorija za imunogenetiku KB Split Križine: mr. sc. Roku Martiniću, dr. med., laborantima Ani Amižić i Jeleni Kunac na pomoći oko pohrane i sortiranja uzoraka, kao i izrade.

Neizmjerne hvala obitelji Ivanišević na donaciji za nabavku protočnog razvrstavača stanica tako da se imunološka tipizacija limfocita mogla izraditi u Splitu.

Hvala Kristini Drnasin, dr. med., doc. dr. Igoru Aureru, mr. sc. Ljubici Škare, dr. med., Dominiku Loziću, dr. med. i Marinki Jakić-Bubalo, dr. med. na pomoći u sakupljanju uzoraka, a dr. Oktaviji Đaković-Rode na korisnim savjetima.

Doc. dr. Anti Rozgi, ing. Vesni Čapkun, prof. Goranu Kardumu i Nelly Peer zahvaljujem na pomoći pri sortiranju podataka i statističkoj obradi.

Najljepša hvala mojim sestrama s Kliničkog odjela za dječju hematologiju, onkologiju, imunologiju i medicinsku genetiku na svesrdnom bodrenju i pomoći kod uzimanja uzoraka, a mojim kolegicama Dubravki Kuljiš, dr. med. i Višnji Armanda, dr. med. na podršci i razumijevanju.

*Ovu disertaciju i neizmjernu ljubav posvećujem sinu Pavlu i roditeljima Perici i Anti, bratu Zoranu i njegovoj obitelji, Igorki, svojim prijateljima.*

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	9
1.1. Dosadašnja istraživanja.....	9
1.2. Trombociti.....	13
1.3. Imunosni sustav.....	14
1.3.1. Limfociti.....	16
1.3.2. Programirana stanična smrt.....	19
1.3.3. Citokini.....	19
1.3.3.1. Proinflamatorni citokini.....	21
1.3.3.1.1. Interleukin 1 .....	21
1.3.3.1.2. Interleukin 2.....	22
1.3.3.1.3. Interleukin 6.....	23
1.3.3.1.4. Čimbenik tumorske nekroze $\alpha$ .....	24
1.3.3.2. Antiinflamatorni citokini.....	25
1.3.3.2.1. Interleukin 4.....	25
1.3.3.2.2. Interleukin 10.....	26
1.3.3.3. Interferoni.....	27
1.3.3.3.1. Interferon- $\alpha$ .....	29
1.3.3.3.2. Interferon- $\gamma$ .....	29
1.3.3.4. Interleukin 3.....	30
1.4. Virusi.....	31
1.4.1. Citomegalovirus.....	31
1.4.2. Epstein-Barrov virus .....	32
1.4.3. Humani herpes virus-6.....	34
1.4.4. Adenovirusi.....	35
1.4.5. Parvovirus B19.....	35
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	37
3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE.....	38
3.1. Ispitanici.....	38
3.2. Materijal.....	39

3.3. Metode.....	39
3.3.1. Kriteriji dijagnoze.....	39
3.3.2. Liječenje AITP.....	40
3.3.3. Određivanje citokina.....	40
3.3.4. Određivanje virusa.....	41
3.3.5. Određivanje cirkulirajućih limfocita.....	41
3.3.6. Plan ispitivanja.....	41
3.3.7. Prikaz rezultata i statistička obrada.....	42
4. REZULTATI.....	43
4.1. Broj trombocita u perifernoj krvi bolesnika s trombocitopenijom pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u djece i odraslih s AITP.....	43
4.2. Koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ u serumu djece s trombocitopenijom pri dijagnozi.....	46
4.3. Koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ u serumu odraslih s trombocitopenijom pri dijagnozi.....	49
4.4. Koncentracije citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ i njihove razlike u djece i odraslih s trombocitopenijom pri dijagnozi.....	52
4.5. Povezanost serumskih koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ s apsolutnim brojem limfocita, postotkom cirkulirajućih limfocita T, B, T4, T8 i NK stanica u djece i odraslih s trombocitopenijom pri dijagnozi. ....	55
4.6. Povezanost serumskih koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ s prisustvom serumskih IgM i IgG protutijela na CMV, EBV, HHV-6, adenovirus i parvovirus B19 u djece i odraslih s trombocitopenijom pri dijagnozi.....	62
4.7. Povezanost serumskih koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ u djece i odraslih s težinom trombocitopenije, njenim trajanjem i terapijskim odgovorom.....	66
4.7.1. Povezanost serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, 10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ u djece i odraslih s brojem trombocita .....	66
4.7.2. Usporedba serumskih koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10,	

TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u djece i odraslih s AITP.....	69
4.7.3. Razlike serumskih koncentracija citokina između ispitanika s akutnom AITP i kroničnom AITP pri dijagnozi i kontrolne skupine.....	72
4.8. Povezanost promjena i prognostičkih vrijednosti serumskih citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ u odnosu na prelazak bolesti u kronični oblik u djece i odraslih s akutnom AITP.....	79
5. R A S P R A V A.....	81
6. Z A K L J U Č C I.....	96
7. S A Ž E T A K.....	98
8. S U M M A R Y.....	100
9. L I T E R A T U R A.....	102

Dodaci: Popis kratica

Popis slika i tablica

Životopis

## Popis kratica

AITP	Autoimuna trombocitopenična purpura
ASH	Američko hematološko udruženje (engl. <i>American Society of Hematology</i> )
BFU-MK	Primitivne megakariocitne kolonije (engl. <i>burst forming units for megakaryocytes</i> )
CD	Diferencijacijska skupina antigena (engl. <i>cluster of differentiation</i> )
CFU-MK	Jedinice koje stvaraju kolonije za megakariocite u koštanoj srži (engl. <i>colony forming units for megakaryocytes</i> )
CIK	Cirkulirajući imuni kompleksi
CMV	Citomegalovirus
ELISA	Enzimska imunoanaliza
EBV	Epstein-Barrov virus
EA	Rani antigen (engl. <i>early antigen</i> )
EBNA	Epstein-Barr antigen jezgre (engl. <i>Epstein-Barr nuclear antigen</i> )
GCS	Glukokortikosteroidi
GM-CSF	Granulocitno-makrofagni faktor stimulacije rasta (engl. <i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> )
GvHD	Reakcija transplantata protiv primatelja (engl. <i>graft-versus-host disease</i> )
HCMV	Humani citomegalovirus
HHV	Humani herpes virus
HLA	Glavni sustav tkivne snošljivosti (engl. <i>human leukocyte antigen</i> )
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPC	Stanice koje stvaraju interferon (engl. <i>interferon-producing cells</i> )
ICISG	Interkontinentalna studijska grupa za dječju ITP (engl. <i>Intercontinental Childhood ITP Study Group</i> )
IVIG	Intravenozni imunoglobulini
LAK	Limfocitima aktivirane stanice ubojice (engl. <i>lymphocyte-activated killer cells</i> )
LMP	Latentni membranski protein
mAb	Monoklonsko protutijelo (engl. <i>monoclonal antibody</i> )



MHC	Veliki sustav tkivne snošljivosti (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
NK	Prirodne stanice ubojice (engl. <i>natural killer cells</i> )
p	Nivo značajnosti
PCR	Lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGF	Čimbenik rasta trombocitnog podrijetla (engl. <i>platelet-derived growth factor</i> )
r	Koeficijent korelacije
RA	Reumatoidni artritis
SD	Standardna devijacija
SE	Standardna pogreška (engl. <i>standard error</i> )
SLE	Sustavni lupus eritematodes
SPSS	Statistički paket za socijalne znanosti (engl. <i>Statistical Package for Social Sciences</i> )
SŽS	Središnji živčani sustav
TCRs	T-stanični receptori (engl. <i>T cell receptors</i> )
TF4	Trombocitni faktor 4
TGF β1	Transformirajući čimbenik rasta β1 (engl. <i>transforming grow factor β1</i> )
Th	Pomoćnički limfociti T (engl. <i>T helper</i> )
TNF	Čimbenik tumorske nekroze (engl. <i>tumor necrosis factor</i> )
Tr	Regulatorni limfociti T (engl. <i>T regulatory</i> )
VE	Viroteh jedinice
VCA	Virusni kapsidni antigen (engl. <i>virus capsid antigen</i> )
VCAM-1	Mononuklearni stanični adhezijski receptor 1 (engl. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i> )
vWF	von Willebrandov faktor
χ <sup>2</sup>	Hi-kvadrat test
X	Srednja vrijednost

## 1. UVOD

Autoimuna trombocitopenija (AITP) je bolest čiji mehanizam nastanka, kao ni terapijski i prognostički parametri, danas još nisu dovoljno i jasno definirani. Radi li se o jedinstvenom entitetu ili o nekoliko imunološki različitih mehanizama nastanka iste bolesti? Stvaraju li se autoprotutijela na vlastite trombocite ili se talože cirkulirajući imuni kompleksi (CIK) na trombocitu ili pak i jedno i drugo? Zašto se kod nekih bolesnika bolest javlja u akutnom obliku kao jedan i jedini napad, a kod drugih kao rekurentna bifazična ili rekurentna multifazična bolest? Zahvaća li patološki imunološki proces samo trombocite ili megakarioblaste i megakariocite kao preteče trombocita? Odgovori na ova pitanja su nejasni i ostaju predmetom akademskih rasprava.

George i suradnici su procijenili da je učestalost AITP od 1,0 do 12,5 slučajeva na 100,000 osoba godišnje. Jednako je zastupljena u djece i odraslih (1).

U djece je AITP imunološka bolest krvarenja jasno definirana kao akutna, kronična i rekurentna. Liječi se samo ako krvarenje ugrožava život. Često nastaje nakon virusne ili bakterijske infekcije i najčešće prestaje spontano unutar 6 mjeseci. U 10-20 % djece akutna AITP prelazi u kroničnu formu u obliku perzistirajuće trombocitopenije, koja traje duže od 6 mjeseci.

Za razliku od AITP u djece, AITP u odraslih je najčešće kroničnog oblika i često zahtijeva liječenje imunosupresivnim lijekovima ili splenektomiju.

### 1.1. Dosadašnja istraživanja

Dijagnoza AITP se još uvijek bazira na anamnezi, kliničkom pregledu, kompletnoj krvnoj slici i razmazu periferne krvi s ciljem da se isključe ostali uzroci trombocitopenije.

AITP općenito klasificiramo prema broju trombocita i kliničkoj manifestaciji krvarenja u 4 stupnja (tablica 1) (2).

Tablica 1. Podjela autoimmune trombocitopenije prema stadiju bolesti

Stadij	Klinička manifestacija	Laboratorijski nalazi
I	Nema krvarenja	Broj trombocita $> 20 \times 10^9/L$
II	Blago krvarenje/po koja petehija, modrica ili blago krvarenje iz nosa	Broj trombocita $\leq 20 \times 10^9/L$
III	Značajno krvarenje, gastrointestinalno krvarenje, jaka hematurija, krvarenje iz nosa koje zahtijeva transfuziju crvenih krvnih zrnaca	Broj trombocita $\leq 20 \times 10^9/L$ i/ili značajno sniženje hemoglobina ( $\leq 100 \text{ g/L}$ )
IV	Krvarenje u organe ili krvarenje koje ugrožava život, krvarenje u CNS	

(Prema: Minchinton R, Blanchette V, Imbach P, Akatsuka JI, Nugent D. International Study on EARLY CHRONIC ITP in Children and Adolescents. ITP Staging.1995; Appendix 3.)

Brojne internacionalne studije ispituju parametre relevantne za prognozu AITP. Takvim parametrima bi se moglo odrediti hoće li bolesnik razviti ranu kroničnu AITP i može li liječenje kortikosteroidima ili intravenoznim imunoglobulinima (IVIG) poboljšati prognozu bolesti u djece s ranom kroničnom AITP (3).

Trombociti su neophodni za normalno zgrušavanje krvi, tako da osobe koje imaju jako sniženi broj trombocita mogu lako prokrvariti, a ponekad ta krvarenja mogu biti ozbiljna i po život opasna. Kada dijete prvi put dolazi na pregled, liječnik ne može predvidjeti hoće li njegova bolest biti kronična, jer se dijagnoza rane kronične AITP može postaviti tek ako je bolest prisutna duže od 6 mjeseci.

Američko udruženje za hematologiju (engl. *American Society of Hematology* - ASH) je donijelo panel praktičnih smjernica i preporuka za dijagnozu i liječenje AITP u djece i odraslih (4).

U djece je preporučeno da se dijagnoza AITP postavi na osnovu anamneze, fizikalnog pregleda, kompletne krvne slike i analize razmaza periferne krvi, koji će isključiti ostale uzroke trombocitopenije. Analiza koštane srži (KS) se preporuča ako dijete ima perzistentnu trombocitopeniju, koja traje više od 6-12 mjeseci ili kod one djece koja ne odgovaraju na terapiju IVIG-om.

Nije potrebno hospitalizirati i liječiti djecu koja imaju broj trombocita u perifernoj krvi  $> 30 \times 10^9/L$ , a nemaju simptome bolesti. Njima nije potrebno davati IVIG, kortikosteroide, niti anti-Rh(D) kao rutinsko liječenje. Djeca koja imaju broj trombocita  $< 20 \times 10^9/L$  i značajna krvarenja iz sluznica, kao i djeca koja imaju broj trombocita  $< 10 \times 10^9/L$  uz manju purpura, trebala bi biti liječena kortikosteroidima ili IVIG-om. Djecu s teškim krvarenjem, koje im ugrožava život, treba liječiti visokim dozama kortikosteroida, IVIG-om i transfuzijama trombocita. Ako se planira splenektomija, dijete treba preoperativno pripremiti IVIG-om (4).

U odraslih osoba, prema preporuci ASH-a, dijagnoza AITP se može postaviti također na osnovu anamneze, fizikalnog pregleda, kompletne krvne slike i analize razmaza periferne krvi, koji će isključiti ostale uzroke trombocitopenije. Analiza KS se preporuča kod bolesnika starijih od 60 godina i onih kod kojih se predviđa splenektomija. Ne hospitaliziraju se bolesnici čiji je broj trombocita u perifernoj krvi  $> 20 \times 10^9/L$  ako nemaju simptome bolesti ili imaju blagu purpuru.

Oni čiji je broj trombocita u perifernoj krvi  $> 50 \times 10^9/L$  ne zahtijevaju rutinsko liječenje IVIG-om ili kortikosteroidima. Liječenje je indicirano u bolesnika s brojem trombocita u perifernoj krvi  $< 20 \times 10^9/L$  i  $< 50 \times 10^9/L$  ako imaju značajna krvarenja iz sluznica ili imaju rizične čimbenike krvarenja kao što su povišen krvni tlak i peptički ulkus. Hospitalizacija se preporuča bolesnicima s brojem trombocita  $< 20 \times 10^9/L$  i značajnim krvarenjima.

Odrasli bolesnici s krvarenjem opasnim po život liječe se visokim dozama parenteralnih kortikosteroida, IVIG-om i transfuzijama trombocita (4). Različiti patogenetski mehanizmi mogu biti odgovorni za nastanak akutnog ili kroničnog oblika

ove bolesti. Jedan od mogućih etioloških čimbenika je poremećaj ravnoteže citokina, koji je zamijećen u tih bolesnika (5-7).

Danas se još uvijek malo zna o ulozi citokina u autoimunoj patogenezi ove bolesti. Citokini su polipeptidi koji djeluju najčešće lokalno i vrlo su važni čimbenici obrambenog sustava (8). Njihova aktivnost je izražena i u ekstremno niskim koncentracijama. U različitim patološkim stanjima citokini mogu imati sistemski učinak i tada se mogu otkriti u serumu bolesnika (8).

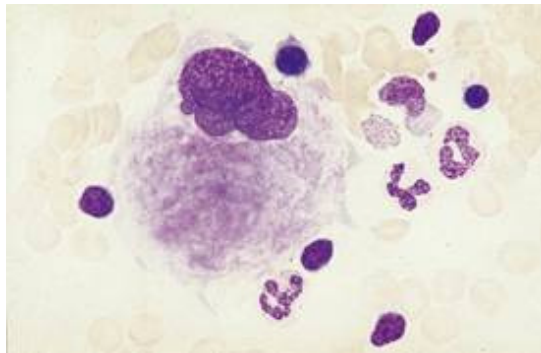
Upalni citokini, kao što su čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor*  $\alpha$  - TNF- $\alpha$ ), interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), važni su u patogenezi autoimunih bolesti, reumatskih i ostalih bolesti vezivnog tkiva, kao i autoimunih endokrinih bolesti (9,10). Citokini imaju važnu ulogu i u usmjeravanju imunološke reakcije limfocita Th1 (engl. *T helper* – Th) i Th2 (11,12). Neravnoteža između proinflamatornih Th1 i antiinflamatornih Th2 citokina pogoduje nastanku autoimunih bolesti (13). U bolesnika s kroničnom AITP primarno su nađene povećane vrijednosti IL-2, IFN- $\gamma$  i IL-10, što se odražava na Th0- i Th1-staničnu aktivaciju (5).

Različiti antigeni, posebice virusi, mogu izazvati neravnotežu citokina. Grupa herpes virusa, primjerice citomegalovirus (CMV), Epstein-Barrov virus (EBV) (14-18), humani herpesvirus-6 (HHV-6) (19,20), adenovirus i parvovirus B19 su najčešći uzročnici infekcije u djece, a mogu oštetiti njihov imunski sustav i izazvati određeni oblik autoimune bolesti, između ostalog i AITP. Tako je za HHV-6 pokazano da ima imunomodulatornu aktivnost potičući lučenje TNF- $\alpha$  i IFN- $\alpha$  (20).

Hipoteza od koje polazi ovo istraživanje jest da i u akutnoj AITP poremećaj citokinske ravnoteže igra važnu ulogu u patogenetskom mehanizmu nastanka bolesti, te da se vjerojatno razlikuje u djece i odraslih ljudi. Svrha ovog doktorskog rada je, između ostalog, procjena važnosti i uloge citokina u patogenezi AITP i to posebno za one citokine za koje se zna da sudjeluju u regulaciji i kontroli limfopoetskog i mijelopoetskog sustava.

## 1.2. Trombociti

Trombociti ili krvne pločice su stanice bez jezgre, a nastaju iz citoplazme pupanjem membrane citoplazme svojih preteča megakariocita, koji su primarno smješteni u KS, gdje ih ima 0,5% svih stanica. Oni nastaju iz primitivnih megakariocitnih kolonija (engl. *burst forming units for megakaryocytes* - BFU-MK) i jedinica koje stvaraju kolonije za megakariocite u koštanoj srži (engl. *colony forming units for megakaryocytes* - CFU-MK). Kolonije ovih stanica proliferiraju u megakariocite (slika 1).



Slika 1. Zreli megakariocit

Diferencijacija u zrele megakariocite odvija se pod djelovanjem različitih citokina, uključujući trombopoetin, primarni fiziološki regulator stvaranja trombocita, koji djeluje sinergistički s ostalim citokinima ubrzavajući sazrijevanje citoplazme megakariocita. Stvara se kontinuirano u jetri, slezeni i u stromalnim stanicama KS (21). Megakariocitopoezu još stimuliraju i eritropoetin (EPO), IL-1, IL-3, IL-6, IL-11 i čimbenik stimulacije granulocita i makrofaga (engl. *granulocit-macrophage colony stimulating factor* - GM-CSF) (22,23). Najnezrelija stanica trombocitne loze je megakarioblast, koja sazrijeva u promegakariocit i konačno u megakariocit. Jezgra megakarioblasta je lobulirana i sinhrono se dijeli bez dijeljenja citoplazme. Citoplazma sadrži specifične trombocitne granule i demarkacijski sustav membrane (24). Kod AITP u KS možemo naći povećani broj megakariocita.

Iz svakog megakariocita nastane oko 4000 trombocita. Ciklus nastanka traje deset dana. Nakon otpuštanja iz KS mladi trombociti se zadržavaju u slezeni 36 sati prije ulaska u cirkulaciju gdje primarno sudjeluju u hemostazi (25). Slezena je spremište trombocita i u njoj je pohranjena 1/3 ukupnih trombocita.

Trombociti se uništavaju u KS, jetri i slezeni. Dužina života trombocita u perifernoj krvi je 9-11 dana, a normalan broj je, bez obzira na dob,  $150-450 \times 10^9/L$ . Diskoidnog su oblika, veličine prosječno 1-2 mikrometra, dok je prosječni stanični volumen 5.8 fL. Mlađi trombociti su veći, a veličina im se smanjuje sa starošću.

Membrana trombocita sadrži glikoproteine, koji su nužni za početak adhezije, agregacije i stvaranja trombocitnog čepa tijekom hemostaze. Trombociti sadrže guste granule i alfa granule. Guste granule sadrže nucleotide ADP, ATP, kalcij, serotonin i pirofosfat, dok alfa granule sadrže fibrinogen, vWF, trombocitni factor 4 (TF4), fibronektin, beta-tromboglobulin, čimbenik rasta trombocitnog podrijetla (engl. *platelet-derived growth factor* - PDGF) i trombospadin. Nakon adhezije fosfolipidi na površini trombocita uspostavljaju interakciju i aktivaciju koagulacijskih faktora u kaskadi koagulacije (24). Najvažnija funkcija vWF-a je održavanje adhezivnih interakcija trombocita u brzjoj struji krvi. Trombociti imaju dva receptora za vWF glikoprotein Iba i integrin GP IIb-IIIa kompleks (26). Oslobođanje vWF-a iz endotelne stanice nastaje pod utjecajem adrenalina i dezmopresina kod napora i stresa čime se znatno povećava njegova koncentracija u cirkulaciji (24).

### **1.3. Imunosni sustav**

Imunosni sustav u organizmu čovjeka je odgovoran za otpornost prema infekcijama i bolestima, a posebno za prepoznavanje vanjskih stranih i čovjekovih vlastitih antigena. Ovaj sustav dijelimo na prirodni i stečeni od kojih svaki ima svoju funkciju i ulogu.

Filogenetski primitivniji prirodni imunosni sustav predstavlja inicijalnu obranu protiv različitih patogenih organizama, olakšava djelovanje specifične imunosti, a vezan je uz fagocitne stanice (neutrofile, monocite i makrofage), one koje izlučuju upalne medijatore (bazofili, mast stanice i eozinofili) i prirodno ubilačke stanice (engl. *natural*

*killer cells* - NK). U molekularne komponente prirodnog imuniteta ubrajamo komplement, proteine akutne faze i citokine kao što su interferoni.

Stečeni imuni odgovor je organiziran pomoću dvije vrste specijaliziranih stanica limfocita T i B, koji su antigen specifični i nakon stimulacije površinskih receptora antigenom počinju proliferirati (27). Svaki od ovih limfocita posjeduje strukturalno jedinstvene receptore, čiji je repertoar u cijeloj populaciji limfocita vrlo širok i ekstremno različit. Sve to povećava mogućnost susreta antigena sa receptorom i na taj način podržava aktivaciju i proliferaciju stanica. Specijalizirane stanice, koje nazivamo antigenpredočnim stanicama, predočuju antigen limfocitima i surađuju s njima u odgovoru na stimulaciju antigenom. Da bi imunost sustav mogao biti učinkovit, neophodna je klonalna ekspanzija limfocita kao odgovor na infekciju.

Danas je jasno da je limfoidno tkivo, kao što su limfni čvorovi i slezena vrlo važno mjesto gdje nastaje primarni imuni odgovor. Limfni čvorovi sakupljaju antigene iz tkiva iz kojih dreniraju limfu i jako utječu na limfocite T i B iz krvi kroz specijalizirane venule koje sadrže mnogo endotela (28). Imunost i autoimunost su vezane uz monocitno-makrofagni sustav, koji je lokaliziran u važnim strukturama organizma kao što su koštana srž, timus, slezena, limfni čvorovi, krvne i limfne žile, sluznica dišnog, probavnog i mokraćnog sustava. Danas su poznata dva tipa specifične imunosti:

1. Humoralna imunost vezana uz limfocite B (engl. *bone marrow derived lymphocytes* - limfociti proizašli iz koštane srži)
2. Celularna imunost vezana uz limfocite T (engl. *thymus derived lymphocytes* - limfociti proizašli iz timusa)

Jedna od vrlo važnih karakteristika imunostnog sustava jest da razlikuje vlastito od stranog. U posljednjih dvadeset godina mnogo je novih saznanja o biologiji, funkcijama imunostnog sustava, molekularnoj genetici i funkciji limfocita.

Do sada je dato 10 Nobelovih nagrada za medicinsku fiziologiju, područje imunologija, što govori da je u svijetu prepoznata važnost ove grane medicine koja zadire od trudnoće, cijepljenja pa do malignih bolesti. Jednim od većih napredaka na polju imunologije smatra se rad Zinkernagel i Doherty o specifičnosti stanične imune obrane (29).



### 1.3.1. Limfociti

Limfociti su stanice koje prepoznaju antigen i nakon prepoznavanja imunološki reagiraju. Kao i sve stanice imunskog sustava potječu iz krvotvorne matične stanice. Negdje 1960. godine saznajemo da limfocite možemo podijeliti u dvije populacije na osnovu njihova podrijetla i funkcije. Tijekom 1970. godine razvoj monoklonalnih protutijela je omogućio diferenciranje subpopulacija limfocita T, B i NK stanica.

Da bismo mogli raspoznati o kojim se stanicama radi pomaže nam diferencijacijska skupina antigena (engl. *cluster of differentiation* - CD), sustav koji definira molekule na površini stanice. Stanice označavamo velikim slovima CD i brojem kojim je određena stanica. Broj stanice se piše odmah uz slova, npr. CD8.

Monoklonalnim protutijelima otkrivamo T stanične antigene pomoćničkih limfocita ili supresorsko-citotoksičnu populaciju. Limfocita T ima oko dvostruko više nego limfocita B. Limfociti T imaju karakteristične T-stanične receptore (engl. *T cell receptors* - TCRs) koji mogu prepoznati antigen prezentiran putem velikog sustava tkivne snošljivosti (engl. *major histocompatibility complex* - MHC) na površini stanica koje su u stanju predočiti antigen.

U posljednjih 10 godina uvedena je bazična terminologija u opisivanju subpopulacija limfocita T. Prepoznati su CD4 (pomoćnički) limfociti T koji luče citokine i CD8 (citotoksičko/supresorski) limfociti T.

Stanice imunskog sustava moraju se međusobno prepoznati da bi mogle međusobno komunicirati. Ovo prepoznavanje se odvija pomoću polimorfnih staničnih površinskih antigena koje kontroliraju geni glavnog sustava tkivne snošljivosti (engl. *human leukocyte antigen* - HLA), koji se nalaze na kratkom kraku kromosoma 6. Klasa I antigena HLA-A, B i C se nalazi na površini svih stanica s jezgrom i važna je za prepoznavanje virusom inficiranih stanica od strane limfocita T8. Klase II antigena HLA-DR, DQ i DP raspoređene su na makrofazima, limfocitima B, Langerhansovim stanicama u koži i dendritičnim stanicama (engl. *dendritic cells* - DC) u različitim organima. Pomoću molekula klase II makrofazi prezentiraju antigen limfocitima T4 potičući imunost koja je vezana uz limfocite T8, a potičući i limfocite B da stvaraju imunoglobuline (30,31).

Supresija imunog odgovora na vlastite antigene je regulirana pomoću limfocita T8. Razlikujući tuđe od vlastitog, pomoću brojnih polimorfnih HLA antigena, imunosni sustav može prepoznati strane antigene i reagirati na njih. Na taj način omogućava zaštitu organizma od virusne ili mikrobne invazije, kao i određenih malignih bolesti koje se prezentiraju kao novi antigeni.

Iz prethodno nezrelih limfoidnih stanica, limfociti B sazrijevaju u KS, a limfociti T u timusu. Procese sazrijevanja ovih stanice kontroliraju brojni citokini. Dvije populacije limfocita pomoćnički i citotoksičko/supresorski limfociti T imaju različitu funkciju, ali i jedni i drugi prepoznaju samo peptidne antigene, koji su vezani uz sustav MHC. Limfociti T4 i njihovi citokini su glavni regulatori imunološke reakcije.

Limfociti T4 specijalizirani su u prepoznavanju intracelularnih patogena ili njihovih produkata, aktivaciji makrofaga, ostalih limfocita T i NK stanica. Mogu uništiti ciljane stanice kao što su inficirani monociti i makrofazi, pomoću Fas-Fas liganda (FasL).

1986. godine Mosman je predložio da se limfociti T4 kategoriziraju prema citokinima koje proizvode (32). Limfociti T4 mogu se podijeliti u 4 važna tipa stanice, a podjela je bazirana na funkcionalnim karakteristikama limfocita:

1. Tip 1 (engl. *T helper 1* - Th1) limfociti T4 koji izlučuju IL-1, -2, -3, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  i GM-CSF, ali ne IL-4, -5 ili -6. Važne su im funkcije reakcija kasne preosjetljivosti, aktivacija makrofaga i reakcije stanične citotoksičnosti. Limfociti Th1 su proinflamatornog fenotipa.
2. Tip 2 (engl. *T helper 2* - Th2) limfociti T4 koji luče IL-3, -4, -5, -6, -9, -10 i GM-CSF, ali ne IL-2 ili IFN- $\gamma$ . Suraduju s limfocitima B, stimuliraju sekreciju IgE, aktiviraju bazofile i mastocite i inhibiraju makrofage. Limfociti Th2 su antiinflamatornog fenotipa.
3. Tip 0 (engl. *T helper 0* - Th0) limfociti T4, koji se ne polariziraju u Th1 ili Th2 fenotip i mogu lučiti proinflamatorne (IFN- $\gamma$ ) i antiinflamatorne citokine IL-4. Nastaju iz nezrelih limfocita T4. Th0 subpopulacija izlučuje IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  i IL-10. Većina klonova neimuniziranih i imuniziranih ljudi je Th0. Ove stanice suraduju s limfocitima B.
4. Tip 3 (engl. *T helper 3* - Th3) limfociti T4 su jedinstvene stanice, koje se ne polariziraju u Th1 ili Th2 fenotip i prvenstveno izlučuju transformirajući

čimbenik rasta  $\beta 1$  (engl. *transforming grow factor*  $\beta 1$  - TGF  $\beta 1$ ), koji je povezan s CD4+CD25+ regulatornom funkcijom limfocita T (Tr). Djeluju supresivno za Th1/Th2 i ostale imune stanice (33).

Van der Graaff smatra da neravnoteža između proinflammatoryh limfocita Th1 i antiinflammatoryh Th2 ima za posljedicu stvaranje IFN- $\gamma$  i IL-4 što može biti od važnosti u nastanku autoimunih bolesti (34).

Limfociti T8 prepoznaju antigen predstavljen putem sustava MHC i uništavaju inficirane stanice spriječavajući tako umnožavanje virusa. Aktivirani limfociti T8 luče IFN- $\gamma$ , koji zajedno s IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$  koje stvaraju inficirane stanice, uspostavljaju stanje rezistencije stanice na virusnu infekciju. Eliminiraju virusom zaražene stanice, koje same sebe označe kao metu istim limfocitima T8 eksponirajući na površini peptide nastale iz staničnih viralnih proteina. Nastaje kompleks viralni peptid - MHC, nakon čega se aktiviraju proteolitički enzimi posrednici u apoptozi ciljnih stanica iz kojih se oslobađa virus, koji postaje dostupan protutijelima.

Limfociti T8 također stvaraju brojne citokine uključujući TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . Imaju sposobnost liziranja ciljnih stanica, citotoksični su za aloantigene, te imaju pomoćnički i supresorski učinak na stvaranje protutijela od strane limfocita B. Potiču nastanak kasne upalne reakcije i reakciju transplantata protiv primatelja (engl. *graft versus host disease* – GvHD).

Limfociti T4 prepoznaju antigen predstavljen pomoću MHC klase II molekule, a oni Th1 i Th2 populacije mogu postati citotoksični nakon što prepoznaju peptide, koje prezentira MHC klasa II molekule. Limfociti Th se diferenciraju u nekoliko faza. Prekursori Th (Thp) koji izlučuju IL-2 se nalaze među neaktiviranim limfocitima T4.

Različiti steroidni hormoni moduliraju odgovor limfocita T. DHEA ili njegovi nepoznati metaboliti potiču Th1 skupinu povećavajući stvaranje Th1 citokina kao što su IL-2, IFN- $\gamma$ . Pojačava izlučivanje IL-2 iz stanica periferne krvi u čovjeka (35-37).

NK stanice određenih fenotipskih karakteristika, izražavaju CD4 obilježje i T stanične receptore vrlo uskog repertoara djelovanja. Ove stanice prepoznaju antigen putem neklasične MHC molekule CD1 i mogu imati imunoregulatornu ulogu jer luče IL-

4 i IFN- $\gamma$ . Oštećena aktivnost NK stanica obično je udružena s teškom humanom herpes infekcijom uključujući i EBV infekciju.

### **1.3.2. Programirana stanična smrt**

Imunosni sustav je jedini kod kojeg nastaje značajno umnožavanje stanica kao imuni odgovor na infekciju ili kontakt sa stranim antigenom. Aktivirane citotoksične stanice zajedno s toksičnim medijatorima i snažnim citokinima moraju biti kontrolirane, jer bi inače mogle jako štetiti samom organizmu. Da bi se mogle odstraniti suvišne stanice potrebno je da one same sebe unište, a to je moguće pokretanjem procesa apoptoze, to jest programiranog samouništenja stanice. Najvažnija molekula koja regulira smrt aktiviranih limfocita je Fas (CD95), a nalazi se na površini limfocita T i B (38).

Limfociti T i B umiru apoptozom. Nakon kontakta s antigenom Fas ekspresija na površini stanice raste, kaskadno se aktiviraju stanične proteaze što dovodi do apoptoze. Ekspresiju Fas liganda, koja se pojavljuje nakon aktivacije zrelih limfocita T4 i T8, regulira imunosni sustav. Programirano samouništenje stanice može biti stimulirano oštećenjem DNK, pomoću TNF- $\alpha$  ili nedostatkom IL-3 (39,40). Za vrijeme apoptoze stanice jezgra se kondenzira, DNA se degradira u mnogo komadića i na kraju stanica kolabira u multiple fragmente koje fagociti odstrane. Defektna apoptoza limfocita može dovesti do različitih autoimunih bolesti.

Shenoj sa suradnicima je dokazao u 25% bolesnika s autoimunom hematološkom citopenijom defekt u staničnoj smrti limfocita vezan uz oštećenu Fas ekspresiju, koja se može oporaviti pomoću rekombinantnog IL-2. Zaključio je da oštećena Fas ekspresija sa ili bez defektnog odgovora na IL-2 može biti uzrokom hematoloških autoimunosti (41).

### **1.3.3. Citokini**

Citokini su polipeptidi ili glikopeptidi molekularne mase od 6-70 kDa, a djeluju preko specifičnih receptora u samoj stanici i na staničnoj membrani. Mogu biti pozitivni i negativni regulatori imunog odgovora. Oni su glasnici koji, pored hormona i neurotransmitera, spadaju u vrlo važne čimbenike u komunikaciji između ljudskih

stanica. Citokini predaju informaciju ciljnoj stanici, koja ispoljava odgovarajući receptor. Nastaje aktivacija gena s posljedičnim fenotipskim ili funkcionalnim promjenama ciljne stanice. Sintezu i otpuštanje citokina mogu zaustaviti inhibitori modulirajući biološku aktivnost citokina ili inhibirajući sposobnost odgovora ciljne stanice.

Aktivnost citokina ovisi o njihovoj koncentraciji u mikrookolišu i jačini ekspresije specifičnih receptora na površini ciljne stanice. U ljudskom organizmu svaka živa stanica s jezgrom stvara citokine. Vrsta citokina i količina sekrecije ovisi o tipu i stadiju diferencijacije stanice te aktivacijskom stadiju iste. Stvaranje ovih polipeptida potaknuto je antigen specifičnom aktivacijom limfocita T4. Interakcija citokina s receptorima za citokine rezultira aktiviranjem kaskade signala u stanici. Aktiviraju se faktori transkripcije, ulaze u jezgu gdje potiču aktivaciju različitih gena.

Riječ *citokini* je izvedena iz dvije riječi grčkog podrijetla - "cytos", što znači stanica, i "kine", iz riječi "kinein", što znači micati se. Ovaj naziv je uveden da bi se mogla razlikovati grupa imunomodulatornih molekula od hematopoetskih čimbenika staničnog rasta.

U citokine spada grupa:

1. interleukina
2. tumorskih čimbenika rasta
3. interferona

Ovakva podjela odgovara biološkim i strukturalnim razlikama, ali i sličnostima ovih medijatora.

Izraz interleukin je prihvaćen za grupu medijatora odgovornih za međusobno komuniciranje leukocita. Danas poznajemo 29 vrsta interleukina, koji se nazivaju od IL-1 do IL-29. Efektorske funkcije ovih proteina su aktivacija i diferencijacija stanice, kemotaksija i proliferacija širokog spektra stanica.

Citokini su efektorske molekule stečene imunosti, koje izlučuju limfociti T (limfokini), dok efektorske citokine urođene imunosti izlučuju mononuklearni fagociti (monokini). Posjeduju brojne biološke aktivnosti i aktivni su u malim picofemtomolarnim koncentracijama. Ponašaju se slično hormonima - kao snažne molekule koje se oslobađaju iz stanica, transportiraju se u druge dijelove organizma i djeluju na funkcije drugih stanica što dovodi do brojnih bioloških učinaka (42). Danas poznajemo

preko 30 različitih citokina. Mnogi od njih su čimbenici rasta stanica, neki su hematopoetski faktori rasta, dok neki imaju antiviralnu aktivnost i nazivamo ih interferonima. Reguliraju rast i diferencijaciju stanica imunskog sustava, a isto tako opseg i dužinu upalnog odgovora. Međusobno su povezani u citokinsku regulacijsku mrežu. Oni modificiraju biološki odgovor, a stimuliraju proliferaciju i diferencijaciju limfocita T i B i makrofaga.

Humani imuni odgovor na infekciju reguliran je ravnotežom između Th1 citokina (IL-2, IFN- $\gamma$ ) i Th2 citokina (IL-4, IL-5, IL-10). IL-4 i IL-10. Mogu olakšati stvaranje protutijela, ali i suprimirati stanični imuni odgovor. Napredovanje infekcije je dodatni negativni učinak ovih imunoregulatornih citokina (43).

Razlikujemo proinflamatorne i antiinflamatorne citokine. Upalni citokini uključujući TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6, aktiviraju koagulaciju i inhibiraju fibrinolizu što može rezultirati difuznim oštećenjem endotela kapilara, s posljedičnom disfunkcijom brojnih organa i smrću (44). Danas znamo da postoji interakcija između hemostaze, upalnih reakcija i imunskog sustava, a isto tako znamo da imunokompetentne stanice i endotel krvnih žila međusobno utječu jedno na drugo. Stvaranje i aktivnosti citokina endotelnih stanica su interes brojnih istraživanja danas (45). Povećano izlučivanje citokina nije udruženo samo s infekcijama nego i s autoimunim i neurodegenerativnim bolestima.

### **1.3.3.1. Proinflamatorni citokini**

#### **1.3.3.1.1. Interleukin 1**

Interleukin 1 (IL-1) je naziv za dva različita proteina, IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , za koje se smatra da su prvi u grupi upalnih i regulatornih citokina i prepoznaju isti stanični receptor (46). Ghezzi je ustanovio da IFN- $\gamma$  regulira stvaranje IL-1 (47). Tilg je ispitivao utjecaj IFN- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  na antagonist IL-1 receptora (IL-1Ra), koji je inhibitor IL-1 i zaključio da interferoni stimuliraju IL-1Ra i na taj način mogu doprinijeti antiviralnom, antiinflamatornom i antiproliferativnom učinku interferona (48). Ne izlučuju ga stanice zdravih individua. IL-1 igraju važnu ulogu u pojačavanju ili smanjivanju upalne reakcije. Smatra se da je ovaj citokin proinflamatoran.

IL-1 igra važnu ulogu u funkciji imunskog sustava, jer utječe na makrofage/monocite, limfocite T i B, NK stanice i limfocitima aktivirane stanice ubojice (engl. *lymphocyte-activated killer cells* - LAK). Inducira sintezu TNF i IL-6 i ima fundamentalnu ulogu u antitumorskoj aktivnosti makrofaga (49). Aktivira limfocite T što rezultira stvaranjem IL-2 (50). IL-1 izlučuju makrofazi, fibroblasti, endotelne stanice, keratinociti, DC, astrociti, limfociti B i aktivirani limfociti T, stanice glatkih mišića i stanice mikroglije (51). Stimulira tumor specifične limfocite T8 i aktivira diferencijaciju limfoidnih stanica.

Snažno inducira matrix-metalloproteinaze, koje degradiraju kolagen što može izazvati uništavanje vezivnog tkiva npr. u zglobovima kod RA (52,53). Ima važnu imunoregulacijsku funkciju, potiče sintezu IL-2 od limfocita T i pomaže ekspresiju IL-2 receptora na aktiviranim limfocitima T. Uz druge interleukine aktivira limfocite B da proliferiraju, sazrijevaju i pojačavaju sintezu imunoglobulina (54). Uloga IL-1 u reumatologiji najprije je dokazana u RA, gdje je upalno promijenjena sinovijalna membrana infiltrirana monocitima i makrofazima, koji su glavni izvori IL-1. Glukokortikoidi značajno smanjuju IL-1 $\beta$  mRNA nivoe inhibirajući učinke IL-1 djelujući na taj način antiinflamatorno i imunosupresivno (55).

#### **1.3.3.1.2. Interleukin 2**

Prvi put opisan je 1976. godine. IL-2 igra središnju ulogu u imunom odgovoru u čovjeka (56-58). To je pleiotropni citokin kojeg primarno stvaraju mitogenom ili antigenom aktivirani limfociti T. Primarno ga sintetiziraju i luče limfociti T4 (Th0, Th1). Stimulira proliferaciju timocita, proliferaciju i diferencijaciju limfocita B, inducira rast i citotoksičnost NK stanica, njihovu citolitičku aktivnost i stvaranje citokina. Značajan je za aktivaciju, proliferaciju i diferencijaciju limfocita T. Stimulira generaciju limfocita T8 (59). Inducira funkciju limfocita T4. Inducira IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . Gen za IL-2 se nalazi na humanom kromosomu 4q (60).

Biološki učinak ostvaruje preko IL-2 receptora (IL-2R) (61). Stalno prisustvo IL-2 je nužno za klonalnu ekspanziju aktiviranih limfocita T i spriječavanje njihove apoptoze. Čak ako nastane blok proliferacije limfocita T IL-2 još uvijek spriječava smrt

stanice (62,63). Povećane vrijednosti su nađene kod različitih autoimunih bolesti, a hipersekrecija endogenog IL-2 može voditi u autoagresiju na više načina, primjerice inducirajući ostale citokine, kao IFN- $\gamma$  i IL-10 (64). Rekombinantni IL-2 koristi se u terapiji bolesnika s HIV infekcijom, jer značajno podiže vrijednosti limfocita T4. Abdel-Raheem i suradnici opisuju nastanak Evansova sindroma u bolesnika koji je liječen sa IL-2 (65). Protutijela na IL-2 ili IL-2R mogu biti korisna u liječenju autoimunih bolesti.

### **1.3.3.1.3. Interleukin 6**

Spada u upalne citokine i luči se tijekom upalnih stanja. Regulira imunski i hematopoetski sustav i uzrokuje reakciju akutne faze upale. Stvaraju ga ne samo imune stanice nego i mnoge neimune stanice i organi (66,67). IL-6 potiče sazrijevanje megakariocita (68). Stimulira hepatocite, skraćuje  $G_0$  fazu hematopoetskih progenitora, podstiče stvaranje imunoglobulina od aktiviranih limfocita B, pojačava stvaranje limfocita T, regulira ekspresiju IL-2R. Sve ove aktivnosti kontrolira jedan te isti gen, koji se nalazi na kratkom kraku kromosoma 7 i sadrži 5 exona i 4 introna (69,70).

Svoje biološke učinke ostvaruje putem membranskih receptora za IL-6, koji se nalaze na mnogim stanicama uključujući megakariocite (71). Potiskuje lučenje TNF- $\alpha$  i IL-1, aktivira i stimulira hipotalamičko-pituitarnu adrenalnu osovину djelujući na kortikotropin-otpuštajući hormon i pomaže kontroli upalne reakcije (72).

Glukokortikoidi inhibiraju transkripciju IL-6 interakcijom ligandom aktiviranim glukokortikoidnim receptorom Re1A subjedinicom transkripcijskog faktora NF-kappaB. Transkripciju IL-6 suprimiraju i estrogeni (73-75).

IL-6 potiče finalno sazrijevanje limfocita B u stanice koje stvaraju protutijela što govori o njegovom sudjelovanju u upalnim procesima nakon imunog odgovora organizma (76).

Za vrijeme upale izlučuju se upalni citokini kao što su TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6. IL-6 tada potiskuje lučenje TNF- $\alpha$  i IL-1 aktivirajući stvaranje reaktanata aktivne faze iz jetre i stimulira osovину hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda i na taj način pomaže kontroli upalne reakcije. U tom smislu IL-6 je proinflamatorni i antiinflamatorni citokin.



Važan je u stimulaciji rane faze hematopoeze. Djelovanje ovog citokina ima brojne biološke posljedice i različito djelovanje na mehanizam hemostaze tako da može povisiti broj trombocita u normalnih i trombocitopeničnih životinja, a isto tako i u ljudi (77-80). Djeluje na sazrijevanje megakariocita povećavajući broj i veličinu stanice i na sintezu trombocitnih proteina. U ljudi koncentracija serumskog IL-6 povećana je u reaktivnoj trombocitozi kod RA ili kod sekundarne trombocitoze uzrokovane anemijom zbog nedostatka željeza. Sve ovo ukazuje na to da citokini mogu biti odgovorni za patološku megakariocitopoezu. IL-6 povećava veličinu trombocita i pojačava njihovu funkciju (81, 82). Kako IL-6 povećava stvaranje trombocita moguće je da promjene u funkcionalnosti trombocita nastaju zato što u cirkulaciju ulaze novi potentniji trombociti, prije nego što bi to bio rezultat utjecaja IL-6 na trombocite (83,84).

Liječenje kortikosteroidima snizuje vrijednosti IL-6 u serumu (85,86). Brojni autori su ispitivali moguću korist dugotrajne aplikacije IL-6 u indukciji trombocitopoeze. Tako je Ryffel sa suradnicima dokazao da se broj megakariocita u koštanoj srži ne povećava djelovanjem IL-6, ali stupanj ploidiije raste što može sugerirati da je učinak IL-6 ograničen na zrele megakariocite in vivo. Povećava vrijednosti fibrinogena u plazmi (87). IL-6 ima sposobnost općenito poticanja limfocita B posebno sekreciju IgG. Također podržava rast limfocita B inficiranih s EBV (88).

#### **1.3.3.1.4. Čimbenik tumorske nekroze $\alpha$**

To je moćan citokin kojeg stvaraju makrofazi, fibroblasti, monociti, limfociti T i B i učinak mu je različit na fiziološki i imunski sustav. Spada u citokine koji nastaju iz makrofaga. Najbolje je proučena njegova sposobnost izazivanja upalne reakcije. Osim što stimulira stvaranje ostalih citokina (IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF) posreduje u kaskadi citokina, koja uzrokuje upalu i destrukciju zglobova u RA preko receptora koji su lokalizirani na makrofazima ili u stanicama u sinovijalnoj membrani (89). Isto kao i IL-1, TNF- $\alpha$  je u stanju inducirati hipoferemiju tako da poveća unos željeza u makrofage i monocite što spada u dio akutne faze imunog odgovora vezanog uz citokine. Alvarez-Hernandez je dokazao da rekombinantni TNF uzrokuje značajni pad serumskog željeza

nakon 6 sati istovremeno ne uzrokujući promjene u totalnom kapacitetu prijenosa željeza (90).

Aktivnost mu je proinflamatorna i antitumorska. Uz mnoge učinke opisana je i njegova sposobnost da potakne smrt stanice. Regulira proliferaciju i diferencijaciju imunih stanica. Ovaj peptid je uključen u procese vezane uz septički šok, autoimune bolesti i GvHD. Indirektno regulira upalnu reakciju tako da stimulira otpuštanje kortikotropina iz hipofize stimulirajući na taj način koru nadbubrežne žlijezde da otpušta kortizol, koji inhibira upalu. Nakon blokiranja TNF- $\alpha$  protutijelima značajno se smanjuje stvaranje IL-1, IL-6, IL-3 i GM-CSF. Blokiranje ovog citokina može imati presudnu ulogu u koncentraciji ostalih citokina u sinovijalnoj tekućini (91). Blokiranjem TNF- $\alpha$  monoklonskim protutijelima (engl. *monoclonal antibody* - mAb) možemo zaustaviti aktivnost bolesti tip II kolagen induciranog artritisa u miša (92).

### **1.3.3.2. Antiinflamatorni citokini**

Dok neki citokini podržavaju upalni proces drugi ga slabe. Dva do sada najbolje ispitane protuupalna citokina su IL-4 i IL-10. Oni zajednički inhibiraju stvaranje upalnih citokina (93,94).

#### **1.3.3.2.1. Interleukin 4**

IL-4 ili B stimulirajući faktor je pleiotropni citokin kojeg primarno stvaraju aktivirani limfociti T, limfociti T4 (Th2), bazofilne i mast-stanice, monociti i makrofazi, neutrofilni, limfociti B i stromalne stanice koštane srži (95, 96). IL-4 podržava humoralni imuni odgovor regulirajući diferencijaciju prekursora subpopulacije limfocita T4 u tip 2 (Th2), koji određuje humoralnu imunost i modulira stvaranje protutijela. Sudjeluje u diferencijaciji i rastu limfocita B, kao i sazrijevanju DC iz makrofaga uz pomoć GM-CSF-a. In vitro inhibira aktivaciju limfocita Th1 i smanjuje stvaranje IL-1 i TNF- $\alpha$  i oštećenje hrskavice. Također inhibira stvaranje IL-6 i IL-8 (94,97).

Može potaknuti nastanak autoimunih bolesti kao što je sustavni lupus eritematosus (SLE). Ovaj citokin prevenira autoimunu bolest sličnu SLE tako da smanjuje pojavu IgG3 nefritogenih autoprotutijela (98).

Nađeno je da je IL-4 značajno povišen kod EBV infekcije u djece u koje je izvršena transplantacija jetre i u koje je lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction* – PCR) dokazana prisutnost ovog virusa što govori o važnoj ulozi ovog citokina u infekciji EBV-om (99).

Povećava rast limfocita B i stvaranje imunoglobulina, modulira mijeloidni rast, pojačava migraciju eozinofila i upalnu reakciju, modulira IL-2 stimulirane LAK stanice.

IL-4 ima inhibitorni profil sličan IL-10, ali za razliku od njega djeluje kod težih oblika RA. Oba citokina smanjuju fagocitnu aktivnost humanih neutrofila kao odgovor na učinke proinflammatoryh citokina (100). Pored gore navedenih aktivnosti poznato je da IL-4 potiče stvaranje IgE, a genetske studije povezuju patogenezu astme s genom za IL-4 (101).

Gen za IL-4 nalazi se na kromosomu 5q, vrlo blizu iznad gena za IL-3, IL-5, IL-13 i GM-CSF (95,96). Sonoda sa suradnicima je ispitivao djelovanje IL-4 na proliferaciju megakariocita u staničnoj kulturi i zaključio da ovaj interleukin može potiskivati humanu megakariocitopoezu in vitro, dok je Snoeck dokazao da inhibira kolonije za makrofage (102,103).

#### **1.3.3.2.2. Interleukin 10**

IL-10 je pleiotropni citokin koji ima imunosupresivni ili imunostimulativni učinak na različite tipove stanica. Humani IL-10 može inhibirati antigenom stimuliranu sintezu citokina ovisnu o monocitima i makrofagima, koja se odvija u mononuklearnim stanicama periferne krvi i NK stanicama. Poznato je da IL-10 može smanjiti ekspresiju MHC II na makrofazima (104,105). Smatra se da IL-10 može inhibirati nastanak i funkciju kostimulatora na membrani makrofaga, koji je potreban za aktivnost limfocita T i NK stanica (106). IL-10 je citokin kojeg najviše luče humani limfociti T4 (Th 0 i Th 2) i monociti i makrofazi, stanice koje prezentiraju antigen. Poznato je da ga luče i limfociti B, kao i mast stanice.

Vjeruje se da ima važnu funkciju potiskivanja imunog odgovora i može biti uključen u održavanje tolerancije imunosnog sustava. Blokira aktivaciju sinteze citokina putem limfocita Th1, aktiviranih monocita i NK stanica. Najvažnije funkcije su koaktivacija limfocita T i B, indukcija klase MHC II, preživljavanje limfocita B i lučenje Ig: IgG1, IgG3, IgA. Može stimulirati limfocite B na stvaranje imunoglobulina. Inhibira stvaranje nekoliko citokina, uključujući IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-8 (105,107,108). Inhibira proliferaciju limfocita T in vitro.

Povećane vrijednosti su nađene u većeg broja bolesnika s AITP. Ima snažan imunostimulatorni učinak na limfocite B i inducira sintezu IgA u CD40 aktiviranim stanicama (109). Stimulira proliferaciju limfocita B u slezeni i tonzilama (110,111). Nedostatak staničnog imuniteta često je udružen s jakim humoralnim imunim odgovorom, a dijelom je uzrokovan inhibicijom Th1 funkcije putem Th-2 citokina IL-10. IL-10 je jak inhibitor Th1 efektornih funkcija in vivo. Ova osobina može biti korisna u kontroli nekih autoimunih bolesti vezanih uz Th1 upalni odgovor (112). IL-10 inhibira gubitak staničnog volumena, kondenzaciju kromatina i DNA fragmentaciju, sve ono što karakterizira smrt stanice apoptozom (113).

U svojim studijama Corinti i Fukao su dokazali da IL-10 prevenira spontano sazrijevanje DC in vitro (114,115). IL-10 može utjecati na homeostazu željeza inducirajući sintezu IFN- $\gamma$  ili TNF- $\alpha$ . Davanje IL-10 povećava nivo feritina u serumu i utječe na nastanak anemije kronične bolesti. IL-10 neposredno modulira sintezu feritina pojačavajući ulaz feritina u monocite.

### **1.3.3.3. Interferoni**

Interferoni nastaju kao odgovor na virus, dvostruku RNA, antigene i mitogene. U čovjeka postoje tri izoforme interferona, a to su: alfa, beta i gama (116).

Ovi proteini brane organizam od virusa, povećavaju otpornost stanica na virusnu infekciju i djeluju kao citokini. Imaju široki spektar djelovanja: važan antimikrobni, imunomodulatorni, antiproliferativni uz poticanje diferencijacije stanica, kao i poticanje apoptoze (117).

Prepoznatljivi su po svojoj sposobnosti da inhibiraju replikaciju virusa unutar stanica. Poznati su inhibitori proliferacije hematopoetskih stanica. Raefsky i suradnici su ispitivali učinak rekombinantnog IFN- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  na stvaranje hematopoetskih kolonija koštane srži. Dokazali su da su oba rekombinantna interferona snažni supresori mijeloidnih kolonija nastalih iz CFU-C i da djeluju sinergistički. IFN- $\gamma$  inhibira eritroidne progenitore i ukupne kolonije CFU-E u koštanoj srži (118).

Neki od interferona (IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ ) mogu se sintetizirati u stanicama kao neposredna posljedica stanične infekcije virusom zaštićujući stanicu od infekcije novim virusom. Drugu grupu interferona (IFN- $\beta$  i IFN- $\gamma$ ) stvaraju limfociti kao odgovor na stimulaciju antigenima. Ovi interferoni imaju produženo antiviralno djelovanje i sudjeluju u eliminaciji virusa iz limfocita. Razlikujemo interferone tipa I i II. U tip I interferon spadaju IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\tau$ . Vežu se na stanične receptore za interferone.

Razlikujemo dva tipa staničnih interferonskih receptora:

1. Receptori tip I koji prepoznaju IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ , ali ne prepoznaju IFN- $\gamma$
2. Receptori tip II koji prepoznaju IFN- $\gamma$ , ali ne i IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ .

Interferonski sustav ima svoju vlastitu funkcionalnu organizaciju. Za stvaranje interferona potreban je induktor koji je najčešće virus, a proizvođač je humana stanica. Stanice koje stvaraju interferon (engl. *interferon-producing cells* – IPC) spadaju u malu populaciju leukocita koji luče velike količine interferona tipa I (IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ ) kao odgovor na virusnu infekciju (119,120). Interferoni moduliraju imunski sustav indukcijom MHC i HLA sustava. Ovisno o tipu stanice koja ga proizvodi interferone dijelimo na IFN- $\alpha$  kojeg stvaraju leukociti, IFN- $\beta$  kojeg stvaraju fibroblasti, IFN- $\gamma$  kojeg stvaraju imunokompetentne stanice. IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$  (Interferoni tipa I) su dosta srodni, a stvaraju ih leukociti i fibroblasti kao odgovor na virus ili dvostruku RNA. Suprotno tome IFN- $\gamma$  (interferon tipa II) je vrlo malo sličan ostalim interferonima, a stvaraju ga najprije limfociti T kao odgovor na mitogene ili izlaganje antigenima.

Utječu na regulaciju stanične funkcije kao što je fagocitoza, ali i povećavaju citotoksičnost limfocita T (IFN- $\gamma$ ), kao i aktivnost makrofaga i NK-stanica (121).

#### **1.3.3.3.1. Interferon- $\alpha$**

IFN- $\alpha$  je jedan od prvih citokina koji nastaje kao odgovor na virusnu infekciju. Ima važna antiviralna i imunoregulatorna svojstva i uspješno se upotrebljava u liječenju različitih oboljenja. Poznate su 23 različite varijante i 12 funkcionalnih IFN- $\alpha$  podtipova koji djeluju preko jednog receptora, koji se naziva IFN- $\alpha\beta$ R (122). Aktivira citotoksičnost NK stanica i pospješuje lizu stanica inficiranih virusom. Pojačava stanični imuni odgovor regulirajući ekspresiju IL-12 receptora i na taj način potiče nastanak limfocita Th1. Razlikujemo 23 različita IFN- $\alpha$  gena, koji se nalaze na kromosomu 9 i kodiraju najmanje 15 funkcionalnih proteina (123). IFN- $\alpha$  potiče ekspresiju MHC I. Za vrijeme infektivne mononukleoze vrijednosti cirkulirajućeg IFN- $\alpha$  su snižene (124). Na taj način EBV inhibirano stvaranje IFN- $\alpha$  sprječava destrukciju imunskog sustava. Ovaj interferon značajno pojačava IL-10, a blago IL-2 i IL-12.

#### **1.3.3.3.2. Interferon- $\gamma$**

IFN- $\gamma$  je citokin molekularne mase oko 25000 daltona. Stvaraju ga aktivirani limfociti T i limfociti T4 kao odgovor na IL-12 i IL-18 i NK stanice, te monociti i makrofazi. Igra vrlo važnu ulogu u obrani domaćina ispoljavajući svoju aktivnost na širokom dijapazonu stanica, regulirajući aktivnost imunih stanica. Njegova biološka aktivnost ovisi o ekspresiji njegovog receptora (125). To je polipeptidni lanac s 1666 aminokiselina i ima samo jedan funkcionalni gen, koji se nalazi na kromosomu 12.

Ima vrlo važnu ulogu u kontroli bakterijskih, virusnih i parazitnih infekcija. Stanični odgovor na IFN- $\gamma$  određuje receptor (IFN- $\gamma$ R) koji aktivira signal prema staničnoj jezgri i konačno regulira ekspresiju gena. IFN- $\gamma$  signal ovisi o broju površinskih receptora koji ga provode (126).

To je najvažniji proinflammatory citokin odgovoran za aktivaciju i reguliranje fagocitne funkcije mononuklearnih stanica. Regulira stvaranje nekoliko imunomodulacijskih i proinflammatory citokina kao što su IL-12 i TNF- $\alpha$ . Snižene

vrijednosti nalazimo kod RA, SLE, limfoma, kongenitalne rubeole ili citomegalije, malarije, herpes simpleks infekcije, AIDS-a, leishmanije i TBC. Receptor IFN- $\gamma$ R1 određuje 30-kb gen, koji se nalazi na dugom kraku kromosoma 6. Taj isti receptor nalazimo na površini skoro svih stanica. Do sada je opisano nekoliko mutacija vezanih uz ove komponente, a bolesnici koji imaju ove mutacije podložni su infekcijama mikobakterija (127).

Neposredno potiskuje eritropoezu, a visoke koncentracije EPO ne mogu poništiti njegov inhibitorski učinak. IL-1 i TNF- $\alpha$  inhibiraju stvaranje eritroidnih kolonija indirektno tako da stimuliraju otpuštanje IFN- $\gamma$  (128,129).

Funkcionalna interakcija IFN- $\gamma$  s molekulama cjelokupne interleukinske i citokinske mreže danas je interes brojnih znanstvenih istraživanja. Koliko je međusobno povezana interleukinska mreža pokazao je Hsu sa suradnicima, kada je dokazao da antiinflamatorni citokini IL-4 i IL-10 inhibiraju IL-2 induciranu sintezu IFN- $\gamma$  (130).

#### **1.3.3.4. Interleukin 3**

IL-3 je citokin koji primarno nastaje iz aktiviranih limfocita T. Stvaraju ga i limfociti T8. Gen za IL-3 nalazi se na humanom kromosomu 5 samo 9 kilobaza daleko od GM-CSF gena. Ovaj pleiotropni čimbenik može stimulirati proliferaciju i diferencijaciju pluripotentnih krvotvornih matičnih stanica, kao i različitih hematopoetskih progenitora.

Djelujući sinergistički s ostalim ranim hematopoetskim čimbenicima rasta (IL-1, IL-6, SCF, G-CSF), potiče proliferaciju multipotentnih progenitora samo u ranom stadiju njihovog razvoja (131). GM-CSF, IL-5, M-CSF i EPO su potrebni za konačnu diferencijaciju ovih s IL-3 induciranih progenitora (132-134). Svoju biološku aktivnost provodi putem receptora na površini stanice.

Učinci humanog i mišjeg rekombinantnog IL-3 na hematopoezu in vivo proučeni su u raznim životinjskim modelima, koji su pokazali da IL-3 može pojačati hematopoezu in vivo. IL-3 ima autokrini učinak na megakariocitopoezu djelujući značajno na megakariocite da otpuštaju čimbenik rasta deriviranog iz trombocita (engl. *platelet-derived growth factor* - PDGF) i TGF  $\beta$ 1.

Ovi čimbenici pojačavaju proliferaciju fibroblasta u KS (135). Hirayama sa suradnicima je dokazao da IL-3 pokazuje negativnu reakciju na ranu B-limfopoezu (136). Povećane vrijednosti IL-3 nađene su u nekih bolesnika sa GvHD.

#### **1.4. Virusi**

Dvije trećine djece s AITP imaju u anamnezi neku od zaraznih bolesti nekoliko dana ili nekoliko tjedana prije pojave trombocitopenije. Smatra se da je pojačano uništavanje trombocita putem monocitno-makrofagnog sustava djelomično odgovorno za trombocitopeniju koja nastaje za vrijeme viremične faze ili danima i tjednima nakon virusne infekcije. Molekularna mimikrija između viralnih antigena i proteina domaćina odgovorna je za nastanak brojnih autoimunih bolesti, pa tako i za pojačano uklanjanje trombocita kod virusom uzrokovanih AITP (137). Više je teorija koje pokušavaju objasniti povezanost virusne infekcije i AITP: pojava trombocitnih reaktivnih protutijela u djece s EBV infekcijom, teorija imunih kompleksa i najbolje dokumentirana teorija molekularne mimikrije (138). Neki od virusa stvaraju svoje vlastite citokine i moduliraju aktivnost citokina u čovjeka. Identificirano je više od 50 različitih virusnih gena modulatora imunog odgovora.

##### **1.4.1. Citomegalovirus**

CMV spada u grupu herpes virusa, koje karakterizira dvostruka DNA. Infekcija citomegalovirusom definirana je kao CMV viremija ili izolacija CMV iz tjelesnih tekućina ili mjesta u tijelu u asimptomatskog bolesnika, dok CMV bolest definiramo kao CMV viremiju ili izolaciju CMV iz tjelesnih tekućina ili prisustvo CMV u histološkim uzorcima inficiranog tkiva u bolesnika s izraženim simptomima bolesti. U bolesnika koji imaju latentnu CMV infekciju postoji rizik reaktivacije bolesti naročito kod imunodeficijentnih stanja (139).

Stečena CMV infekcija je najčešći uzrok EBV-negativne mononukleoze (140). Klinička slika slična EBV infekciji s temperaturom, slabošću, umorom i ponekad grloboljom. Javlja se hepatosplenomegalija, limfadenopatija i virusom transformirani



limfociti u perifernoj krvi do 15%. Može se naći srednja neutropenija i trombocitopenija. Dijagnoza se postavlja na osnovu značajnog porasta CMV IgM u serumu. Primarna infekcija rezultira doživotnim prisustvom virusa u domaćinu, a reaktivacija je česta u imunokompromitiranih osoba. Epidemiološke studije ukazuju da se prenosi krvnim derivatima, koštanom srži ili solidnim organima (141-143). Ispitivanjem transplantiranih organa nađeno je da su primarno mjesto zadržavanja HCMV leukociti (144).

Brojne studije periferne krvi bolesnika s HCMV bolešću ili kod inficiranih ali asimptomatskih bolesnika identificirali su monocite kao predominantno inficirane stanice (145-147). Dokazano je da se virus neograničeno umnožava u tkivnim makrofazima (148,149).

#### **1.4.2. Epstein-Barrov virus**

Ovaj virus su otkrili Epstein, Achong i Barr prije 36 godina u stanicama Burkittovog limfoma pomoću elektronskog mikroskopa (150). Kasnije je dokazano da je isti virus uzročnik infekciozne mononukleoze. Spada u porodicu herpes virusa, a inficira oko 90% ljudi perzistirajući u organizmu cijeli život. Nakon infekcije ulazi u epitelijalne stanice orofarinksa, dok se limfociti B inficiraju gotovo istovremeno. U osoba koje su EBV seropozitivne i onih koje imaju akutnu EBV-om induciranu infekcioznu mononukleozu limfociti B zaraženi EBV-om imaju sposobnost neograničenog rasta.

Nakon rekonvalescencije EBV se nalazi u perifernoj krvi u latentno inficiranim limfocitima B. NK stanice i limfociti T nakon reaktivacije latentne infekcije prepoznaju stanice inficirane virusom i uništavaju ih. Nađene su povišene vrijednosti IL-4, IL-5, IL10 i IFN- $\gamma$  kao imuni odgovor na EBV infekciju u djece kod koje je transplantirana jetra i kod koje je dokazana EBV infekcija (151).

EBV perzistira u epitelnim stanicama orofarinksa i limfocitima B. Limfociti B se inficiraju nakon kontakta sa epitelijalnim stanicama orofarinksa. Neki autori navode da bi limfociti B u orofarinksu mogli biti primarno mjesto infekcije (152). Neka istraživanja ukazuju da u zdravih individua jedan od pedeset limfocita B na milijun u cirkulaciji je inficiran EBV-om i broj latentno inficiranih stanica ostaje stabilan godinama (153,154).

Da bi mogao inficirati limfocite B EBV-u pomaže MHC klasa II molekule kao kofaktor (155).

Ovaj virus je razvio više strategija da bi mogao izigrati imunosti sustav kao što su latentna infekcija sa ograničenom ekspresijom gena, ometanje citokina i limfocita T8. U vrijeme akutne EBV infekcije in vivo svi geni, koji su vezani uz transformaciju virusa ispoljavaju se na limfocitima B i mogu služiti imunosti sustavu kao meta za uništavanje limfocita B (156).

Može se prenijeti slinom, transfuzijama krvi ili transplantacijom KS. Inkubacijski period infekciozne mononukleoze traje od 3 do 7 tjedana. Klasični klinički sindrom mononukleoze je definiran kao trijas temperatura, faringitis i adenopatija. U laboratorijskim nalazima vidljiva je apsolutna limfocitoza s više od 10% virusom transformiranih stanica.

Serološki dokaz EBV infekcije su IgM protutijela na EBV kapsidni antigen (anti-VCA) koja se pojavljuju brzo nakon infekcije i mogu perzistirati tjednima ili mjesecima i dokazuju primarnu infekciju. IgG anti-VCA pojavljuju se u akutnoj fazi i u fazi oporavka, njihov titar raste u početku, nakon čega dolazi do pada.

Protutijela na virusni rani antigen (engl. *early antigen* – EA) (anti-EA) javljaju se kod većine primarnih infekcija s najvećim titrom do 1:640, a s vremenom nestaju (157).

Drugi mehanizam kojim EBV pokušava prevariti imunosti sustav je ometanje citokinske mreže. EBV sadržava genski produkt BCRF1 koji ima više od 80% aminokiselina istih kao humani IL-10 (158). Kao i humani IL-10, EBV IL-10 inhibira sintezu IFN- $\gamma$  pomoću limfocita B i NK stanica, dok IFN- $\gamma$  može inhibirati rast EBV-om transformiranih limfocita B. Oba citokina također inhibiraju sintezu IL-1, IL-12 i TNF od strane makrofaga i proliferaciju limfocita T ovisnu o makrofazima (159). Interakcijom sa specifičnim staničnim receptorima brojni virusni glikoproteini stimuliraju stanice direktno da luče citokine. Prvi val citokina koji se stvaraju za vrijeme EBV infekcije su IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 receptor antagonist i GM-CSF (160).

Virus ometa imunosti sustav tako da suprimira T stanične prepoznavajuće molekule i molekule za adheziju na površini stanice i na taj način zaštićuje inficirane stanice od limfocita T8 (161). Virusni proteini mogu oštetiti sposobnost imunosti

sustava da eliminira virus inhibirajući proliferaciju limfocita T. EBV i humani IL-10 stimuliraju rast i diferencijaciju limfocita B i postižu njihovu EBV-om induciranu transformaciju. Ovaj virus je otkriven u slini više godina nakon primarne infekcije, a autori pretpostavljaju da je orofarinks rezervoar odakle se limfociti B inficiraju u više navrata, odlaze u periferiju gdje mogu biti uništeni pomoću limfocita T (162).

### **1.4.3. Humani herpes virus-6**

HHV-6 je humani T-limfotropni virus otkriven 1986. godine u kulturama mononuklearnih stanica periferne krvi u 6 bolesnika s limfoproliferativnom bolešću. (163). Seropozitivno je 60-80% djece i odraslih. Infekcija se obično događa u ranom djetinjstvu pod slikom egzantema subitum. Filogenetski je najbliži CMV, 66% sekvence DNA CMV i HHV-6 je homologan (164). Opisane su dvije različite varijante HHV-6, HHV-6A i HHV-6B, koje su u 94-96% sekvence nukleotida identične. Obje varijante su izolirane u imunokompromitiranih bolesnika. U organizmu perzistira cijeli život kao inaparentna infekcija i kad bolesnik postane imunodeficijentan može se reaktivirati. U imunokompetentnih osoba u kasnijoj dobi može izazvati sindrom mononukleoze ili neke od autoimunih i malignih bolesti. Limfociti T4 su najvažnije mjesto replikacije HHV-6 virusa, a može se replicirati u limfocitima T8, NK stanicama, makrofazima, stanicama glije, astrocitima i plućnim fibroblastima (165-168). Udružen je s brojnim neurološkim oboljenjima kao što su encefalitis, konvulzije i multipla skleroza (169).

Reaktivacijom može pojačati patogenost drugih virusa, njihovu reaktivaciju ili pogoršati postojeću autoimunu bolest. Danas se istražuje njegov utjecaj putem molekularne mimikrije kao i utjecaj na regulaciju citokinske mreže. Ovaj virus je najprije limfotropan za limfocite T i suprimirajući njihovu funkciju smanjuje sintezu IL-2 i staničnu proliferaciju. Smatra se da ovaj imunotropni virus može direktno inficirati ili interferirati s više važnih komponenti imunskog sustava.

Najnovije spoznaje vezane uz kvantitativni PCR će pomoći da se otkrije priroda ove infekcije u djece i u imunokompromitiranih bolesnika (170,171). Gosselin smatra da herpes virusi, uključujući i HHV-6, mogu selektivno regulirati sintezu citokina i na taj način ometati imunski sustav (172). Različiti autori, kao što su Yoshikawa i Ma,

povezuju HHV-6 s hematološkim bolestima, primarno s trombocitopenijom. Yoshikawa smatra da direktna virusna inhibicija stvaranja trombocita ili induciranje citokina virusom inficiranih stanica može biti mehanizam nastanka trombocitopenije inducirane HHV-6 infekcijom (173,174).

#### **1.4.4. Adenovirusi**

Adenovirusi su pronađeni u praktički svakom organskom sustavu u čovjeka. Adenovirusna bolest je endemična u svako godišnje doba, zahvaća sve dobne skupine a najčešće školsku djecu. Bez simptoma je 50% inficiranih bolesnika. Adenovirusi se mogu replicirati i izazivati bolesti oka, dišnog, probavnog i mokraćnog sustava. Mnoge adenovirusne infekcije prolaze subklinički i virus može perzistirati u domaćinu mjesecima.

Humani adenovirus ima promjer 70-90 nm, nema ovojnicu, ima kapsidu koja sadrži 252 kapsomere, a sastoji se od 13% dvostruke DNA i 87% proteina. Adenovirusi se dobro umnožavaju u jezgrama stanica epitelnog podrijetla. Citopatogeni su za humane stanične kulture najprije bubrega, a zatim i epitelijalnih stanica. Kada je stanica inficirana adenovirusom mogu se vidjeti nuklearne inkluzije koje sadrže DNA. Inficiraju regionalne limfne čvorove. Adenovirusni antigen potiče sekreciju IFN- $\gamma$  iz perifernih mononuklearnih stanica 12 sati nakon inkubacije. Važan je stanični odgovor limfocita T4 na infekciju adenovirusom (175).

Sigurna metoda kojom možemo dokazati da se radi upravo o adenovirusnoj infekciji je izolacija virusa iz zahvaćenih organa ili njihovih sekreta ili ako je oboljenje vezano uz prethodnu epidemiološku situaciju izazvanu adenovirusom. Iako je izolacija virusa zlatni standard u dijagnozi adenovirusne infekcije, da bismo ovom metodom dokazali virus potrebno je nekoliko dana ili tjedana. PCR-om brzo i sigurno možemo dokazati DNA svih 47 tipova humanog adenovirusa (176).

#### **1.4.5. Parvovirus B19**

Parvovirus B19 je jedini poznati parvovirus patogen za čovjeka, kojeg su otkrili Cossart i suradnici 1974. godine (177). Da je ovaj virus uzročnik erythema infectiosum

otkriveno je 1983. godine (178). U djece može uzrokovati polyarthralgia-arthritis sindrom, a u odraslih aplastične krize i fetalnu smrt. Infekciozni eritem je najčešća manifestacija infekcije (179). Nocton i Reid povezuju parvovirus s artritismom u djece (180,181). Foreman i Lefrere naglašavaju povezanost ovog virusa s idiopatskom trombocitopeničnom purpurom (182,183). To je vrlo mali DNA virus (18-24 nm u promjeru), bez ovojnice, s visokom termalnom stabilnošću. Species je specifičan, može rasti u humanim stanicama KS. Jako je patogen za humane eritroidne stanice.

Stanični receptor za parvovirus B19 je antigen P, koji se nalazi na zrelih eritrocitima, eritroidnim progenitorima, megakariocitima, endotelnim stanicama, placenti, fetalnoj jetri i srcu. Umnožavanje virusa uzrokuje smrt stanice blokirajući stvaranje crvenih krvnih zrnaca. Humani parvovirus B19 je jedini član porodice Erythrovirusa. Nalazimo ga svugdje u svijetu, a infekcija može biti tipa epidemije ili sporadična. Anderson navodi da pozitivan IgG ima 2% do 15% djece u dobi od 1 do 5 godina, a 15% do 60% djece u dobi od 5-19 godina života (184). Može se prenijeti i parenteralnim putem, transfuzijom krvi, koncentratima faktora F VIII ili F IX i vertikalno od majke na fetus.

Parvovirus B19 infekcija u zdravih osoba dovodi do rane viremične faze, stvaranja IgM, a zatim i IgG protutijela, uklanjanja virusa i stvaranja trajnog imuniteta. Simptomi infekcije variraju od bolesti bez simptoma do karakterističnog eritema, anemije i artritisa sličnog RA, uz smanjen broj retikulocita, limfocita, neutrofila i trombocita. Aplastična anemija je prolazna u zdrave djece, dok u imunokompromitirane može biti kronična. IgM protutijela mogu se naći i osam mjeseci nakon infekcije (185). Trombocitopenija udružena s parvovirus B19 infekcijom može nastati prije ili poslije pojave osipa.

Virus može spriječiti nastanak megakariocita i inducirati stvaranje anti-DNA i antilimfocitnih protutijela, poremetiti imunski sustav i provocirati nastanak različitih imunoloških oboljenja, pa tako i ITP. Tipična imuna trombocitopenija opisana je kratko nakon pojave erythema infectiosum (186). Pomoću PCR-a se može dokazati virus u organizmu dugo vremena nakon preboljele akutne infekcije (187).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Trombocitopenija je najčešće posljedica imunog mehanizma. U srazu antigen-antitijelo na trombocitnoj membrani, trombociti značajno kraće žive zbog destrukcije /fagocitoze/ od strane mononuklearno-makrofagnog sustava, prvenstveno u slezeni. Za očekivati je da pri tom srazu i međureakciji antigen-antitijelo, te postupku fagocitoze sudjeluju ili se oslobađaju citokini. Stoga je svrha ovog rada procijeniti dijagnostičku i prognostičku vrijednost citokina u djece i odraslih s trombocitopenijom.

Specifični ciljevi rada su:

- 2.1. Odrediti serumsku koncentraciju citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  u djece i odraslih s trombocitopenijom i razlike u odnosu na kontrolnu skupinu.
- 2.2. Odrediti razlike serumskih koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  između djece i odraslih s trombocitopenijom pri dijagnozi.
- 2.3. Utvrditi povezanost serumskih koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  s apsolutnim brojem limfocita, postotkom cirkulirajućih limfocita T, B, T4, T8 i NK stanica u djece i odraslih s trombocitopenijom pri dijagnozi.
- 2.4. Utvrditi povezanost serumskih koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  s prisustvom serumskih IgM i IgG protutijela na CMV, EBV, HHV-6, adenovirus i parvovirus B19 u djece i odraslih s trombocitopenijom pri dijagnozi.
- 2.5. Utvrditi povezanost serumskih koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  u djece i odraslih s težinom trombocitopenije, njenim trajanjem i terapijskim odgovorom.
- 2.6. Utvrditi povezanost promjena i odrediti prognostičke vrijednosti serumskih citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  u odnosu na prelazak bolesti u kronični oblik u djece i odraslih s akutnom AITP.

### 3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Ispitanici

U prospektivno ispitivanje su uključena sva djeca u dobi do 15 godina (n = 48) koja su zaprimljena na Klinici za dječje bolesti Kliničke bolnice u Splitu s potvrđenom dijagnozom akutne AITP u periodu od 01.01.1999. do 30.05.2003. Usporedno su u istraživanje uključeni i stariji od 15 godina s akutnom AITP zaprimljeni na Klinici za dječje bolesti i odrasli bolesnici zaprimljeni na Klinici za unutarnje bolesti Kliničke bolnice u Splitu i Zavodu za hematologiju, Klinike za unutarnje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Rebro u Zagrebu u periodu od 01.01.1999. do 30.05.2003. (n = 19).

Tablica 2. Ispitanici s AITP

	Djeca (N = 48) Ispitivana skupina	Djeca (N = 26) Kontrolna skupina	Odrasli (N = 19) Ispitivana skupina	Odrasli (N = 24) Kontrolna skupina
Dob (godine) Raspon	5 (0 – 14)	6 (1 – 12)	23 (15 – 87)	35 (15 - 50)
Spol M/Ž*	31/17 (65%/35%)	15/11 (58%/42%)	9/10 (47%/53%)	6/18 (25%/75%)

\* M/Ž = Muški/Ženski

Kontrolnu skupinu sačinjavala su zdrava djeca (n = 26), te zdravi odrasli (n = 24) iste dobne skupine i spola, bez znakova trombocitopenije, koji su dolazili dobrovoljno na poziv, a u posljednjih 6 mjeseci nisu imali kliničkih znakova upale ili sličnih bolesti.

Studija je odobrena od Etičke komisije Kliničke bolnice u Splitu, kao i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Roditelji djece i adolescenata s

AITP i odrasli bolesnici su dobili pismenu informaciju o istraživačkoj studiji u okviru obrasca pristanka za sudjelovanje u istoj.

## 3.2. Materijal

Koncentracije citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  i protutijela IgM i IgG na CMV, EBV, HHV-6, adenovirus i parvovirus B19 određena su iz seruma, a apsolutni broj limfocita, cirkulirajući limfociti T, B, T4, T8 i NK stanice iz pune krvi ispitanika. Prisustvo megakariocita određeno je citološkom analizom KS nakon aspiracijske punkcije pri dijagnozi.

## 3.3. Metode

### 3.3.1. Kriteriji dijagnoze

1. Kriterij dijagnoze AITP bio je broj trombocita u perifernoj krvi  $< 80 \times 10^9/L$ , prisustvo megakariocita u KS, bez nekog drugog klinički jasnog stanja koje može uzrokovati trombocitopeniju.
2. Kriterij dijagnoze kronične AITP bio je broj trombocita u perifernoj krvi manji od  $150 \times 10^9/L$  šest mjeseci od dijagnoze AITP.
3. Težina trombocitopenije - Temeljem broja trombocita bolesnici su svrstani u 4 skupine:
  - izrazito teška trombocitopenija: trombociti  $< 10.0 \times 10^9/L$
  - teška trombocitopenija: trombociti od  $10.1 - 30.0 \times 10^9/L$
  - umjereno teška trombocitopenija: trombociti od  $30.1 - 50.0 \times 10^9/L$
  - umjerena trombocitopenija: trombociti od  $50.1 - 80.0 \times 10^9/L$



### 3.3.2. Liječenje AITP

U slučaju izrazite AITP (broj trombocita u perifernoj krvi  $< 20 \times 10^9/L$ ) s kliničkim znakovima krvarenja ili ako je broj trombocita u perifernoj krvi bio  $< 10 \times 10^9/L$  odrasli su liječeni metilprednisolonom 80-100 mg/m<sup>2</sup> s ili bez azatioprina, a djeca s ili bez IVIG-a (Octagam, Octafarma, Beč, Austrija ili Endobulin, Baxter, Beč, Austrija) 1g/kg dva dana za redom.

### 3.3.3. Određivanje citokina

Određene su serumske vrijednosti IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  specifičnim protutijelima u testu ELISA (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*) (188).

Tablica 3. Normalne koncentracije serumskih citokina

Citokin pg/ml	Kontrolna skupina	n	Mean $\pm$ SD	Min-Maks
IL-1 $\alpha$	Djeca	26	2,4 $\pm$ 1,42	0,1 - 4,9
	Odrasli	24	2,7 $\pm$ 1,08	1 - 5,8
IL-2	Djeca	26	29,4 $\pm$ 3,67	18 - 43,2
	Odrasli	24	26,1 $\pm$ 2,58	17 - 31
IL-3	Djeca	26	48,5 $\pm$ 9,53	40,2 - 74,2
	Odrasli	24	70,5 $\pm$ 29,90	31,2 - 150
IL-4	Djeca	26	8,5 $\pm$ 0,31	7,9 - 8,9
	Odrasli	24	10,4 $\pm$ 2,12	7,3 - 14,9
IL-6	Djeca	26	4,5 $\pm$ 0,98	3,2 - 7,1
	Odrasli	24	7,4 $\pm$ 1,58	3,12 - 9,54
IL-10	Djeca	26	18,2 $\pm$ 2,99	16,2 - 28,8
	Odrasli	24	18 $\pm$ 2,9	14,7 - 29,8
TNF- $\alpha$	Djeca	26	22,9 $\pm$ 3,28	19 - 33
	Odrasli	24	20,6 $\pm$ 3,32	17 - 29,4
IFN- $\gamma$	Djeca	26	47,3 $\pm$ 2,22	44,1 - 51,2
	Odrasli	24	54,4 $\pm$ 10,7	36 - 68,3
IFN- $\alpha$	Djeca	26	43,6 $\pm$ 26,65	9,87 - 89
	Odrasli	24	27,7 $\pm$ 21,47	4 - 89

Korišteni su slijedeći kitovi proizvođača R&D Systems, Minneapolis, USA: RD-DLA 50 IL 1 alpha human ELISA; RD-D2050 IL 2 human ELISA; RD-D3000 IL 3 human ELISA; RD-D4050 IL 4 human ELISA; RD-D6050 IL 6 human ELISA; RD-D1000 IL 10 human ELISA; RD-DTA 50 TNF alpha human ELISA; RD-DIF 50 IFN gama human ELISA; RD-41110-1 IFN alpha human ELISA. Koncentracije ispitivanih citokina u zdravih kontrolnih skupina prikazuje tablica 3.

#### 3.3.4. Određivanje virusa

Određena su serumska IgM i IgG protutijela na CMV, EBV, EBV virusni kapsidni antigen (anti-VCA), rani antigen (anti-EA), EBV nuklearni antigen (anti-EBNA samo IgG), HHV-6, adenovirus i parvovirus B19. Upotrijebljeni su standardni postupci: test imunoflorescencije, ELISA i Western-blot esej (189,190).

#### 3.3.5. Određivanje cirkulirajućih limfocita

Apsolutni broj limfocita (CD45+), postotak cirkulirajućih limfocita T (CD3+/CD45+) i B (CD19+/CD45+), pomoćničkih limfocita T4 (CD3+, CD4+/CD45+), citotoksično/supresorskih limfocita T8 (CD3+, CD8+/CD45+) i NK stanica (CD16+, CD56+/CD45+) određeni su pomoću protočnog razvrstavača stanica FACSCalibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, California, USA (#E3906), Software: MultiSET V1.1.2 ili SimulSET v 3.1. (191). Referentne vrijednosti apsolutnog broja limfocita su 4000 – 13500/ $\mu$ L, a postotka cirkulirajućih limfocita T 55% - 84%, B 6% - 25%, T4 31% - 60%, T8 13% - 41%, a NK stanica 5% - 27%.

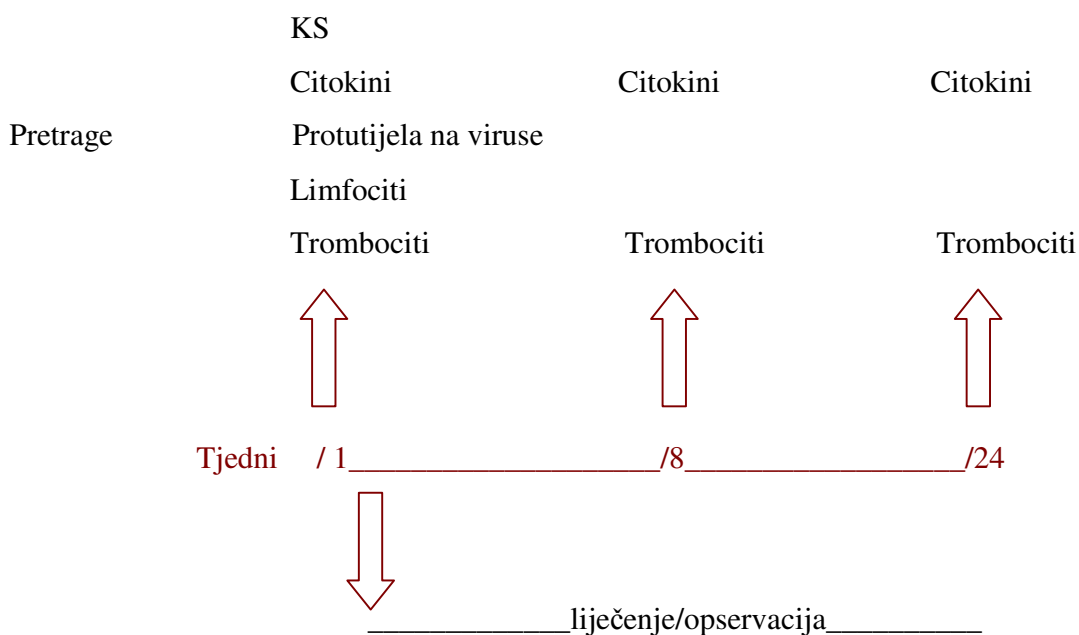
#### 3.3.6. Plan ispitivanja

- Nakon što je postavljena dijagnoza AITP (određivanjem broja trombocita i citološkim pregledom KS) određene su serumske koncentracije citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$ , serumska protutijela na viruse CMV, EBV, HHV-6,

adenovirus i parvovirus B19, apsolutni broj limfocita, postotak cirkulirajućih limfocita T, B, T4, T8 i NK stanica.

- Bolesnici s trombocitima  $< 20 \times 10^9/L$  liječeni su samo metilprednisolonom ili kombinacijom metilprednisolona s azatioprinom i/ili IVIG-om.

- Osam tjedana i 6 mjeseci od dijagnoze određen je broj trombocita u perifernoj krvi i serumske koncentracije citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  (slika 2).



Slika 2. Plan ispitivanja

### 3.3.7. Prikaz rezultata i statistička obrada

Pri statističkoj analizi podataka upotrijebljeni su specijalizirani računalni programi za statističke analize Statistica 6.0 za Windows software i Statistički paket za socijalne znanosti (engl. *Statistical Package for Social Sciences software*, SPSS) verzija 11.0. za Windows software (SPSS od SSCP Inc., Chicago, IL, USA).

Parametrijskim t-testom za nezavisne uzorke s logaritamski transformiranim varijablama uspoređene su serumske koncentracije citokina. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD, minimum, maksimum, t i p vrijednost.

U analizi podataka, prilikom usporedbe dviju nezavisnih varijabli upotrijebljena je analiza varijance s jednim promjenjivim faktorom (ANOVA), a od neparametrijskih metoda klasični  $\chi^2$  test, Fisherov exact test, Kruskal-Wallisova analiza varijance za usporedbu varijabli između više skupina, Mann-Whitneyev test za usporedbu dviju skupina, Friedmanova analiza varijance za usporedbu varijabli mjerenih na istim pacijentima u više navrata (pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci) i Wilcoxonov test (engl. *Wilcoxon Matched pairs test*) za usporedbu jedne varijable mjerene u dva navrata na istim ispitanicima (192,193).

Dobiveni rezultati izraženi su kao aritmetičke sredine i standardne devijacije ( $X \pm$  SD), medijan, minimalna i maksimalna vrijednosti ispitivanih varijabli. Korištena je granična razina značajnosti 5% ( $p < 0,05$ ) i 1% ( $p < 0,01$ ) (194).

Da bi se mogla analizirati povezanost promjena i prognostičkih vrijednosti razine serumskih citokina u odnosu na prelazak bolesti u kronični oblik upotrijebljen je model višestruke regresije kako bi se dobio optimalni broj regresorskih varijabli (prediktora), koje utječu na regresand varijablu. Određen je koeficijent determinacije i protumačenost modela, a F-testom testirana je njegova značajnost (195). Pri tome je u djece s AITP upotrijebljena jednadžba višestruke regresije:  $\hat{y} = 107508 + 1462 \times X_1 - 7462 \times X_2 - 8361 \times X_3 + 3655 \times X_4 + 0,899 \times X_5$ , a u odraslih s AITP jednadžba višestruke regresije:  $\hat{y} = 43766 - 7194 \times X_1 - 6326 \times X_2 + 0,103 \times X_3 + 2793 \times X_4$ .

## **4. REZULTATI**

### **4.1. Broj trombocita u perifernoj krvi bolesnika s trombocitopenijom pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u djece i odraslih s AITP**

Broj trombocita pri dijagnozi bolesti u svih ispitanika bio je snižen kako u skupini djece tako i u odraslih bolesnika (tablica 4). Djeca su imala prosječan broj trombocita pri

dijagnozi  $18,6 \times 10^9/L$  (minimum 0; maksimum  $79 \times 10^9/L$ ; medijan  $8 \times 10^9/L$ ), a odrasli  $36,8 \times 10^9/L$  (minimum  $1 \times 10^9/L$ ; maksimum  $74 \times 10^9/L$ ; medijan  $42 \times 10^9/L$ ).

Iz tablice 4 vidljivo je da je u većine bolesnika došlo do normalizacije broja trombocita nakon 8 tjedana odnosno nakon 6 mjeseci observacije ili liječenja, te je u svega 34,5% djece i 37,5% odraslih nakon 6 mjeseci nađena trombocitopenija. Statistički je značajno porastao broj trombocita nakon 6 mjeseci u djece ( $\chi^2 = 40,82$ ;  $p < 0,001$ ) i odraslih ( $\chi^2 = 10,3$ ;  $p < 0,006$ ).

Tablica 4. Prikaz broja trombocita pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u perifernoj krvi djece i odraslih s AITP i ukupno

	n	Trombociti	Mean $\pm$ SD $\times 10^9/L$	Medijan $\times 10^9/L$	Raspon $\times 10^9/L$
Djeca	45	Pri Dg	$18,56 \pm 21,22$	8,0	0,0 - 79,0
	34	8 tjedan	$160,70 \pm 110,77$	163,5	8,0 - 463,0
	29	6 mjeseci	$191,76 \pm 110,12$	190,0	13,0 - 393,0
Odrasli	19	Pri Dg	$36,84 \pm 24,89$	42,0	1,0 - 74,0
	12	8 tjedan	$127,91 \pm 103,87$	85,0	41,0 - 346,0
	8	6 mjeseci	$179,87 \pm 90,56$	177,5	49,0 - 351,0
Ukupno	64	Pri Dg	$23,25 \pm 23,17$	11,0	0,0 - 79,0
	46	8 tjedan	$152,15 \pm 108,85$	126,0	8,0 - 463,0
	27	6 mjeseci	$189,19 \pm 105,13$	190,0	13,0 - 393,0

Broj trombocita u perifernoj krvi djece i odraslih s AITP pri dijagnozi statistički se značajno razlikovao Mann-Whitney testom ( $z = 2,8$ ;  $p = 0,05$ ) i Studentovim t-testom za nezavisne uzorke ( $t = - 2,99$ ;  $p = 0,004$ ). U djece je bio značajno manji. U svih bolesnika pri dijagnozi djece i odraslih broj trombocita u perifernoj krvi bio je ispod  $80 \times 10^9/L$ .

Analizirajući parametrijskim t-testom broj trombocita u perifernoj krvi u odnosu na spol u djece s AITP nije dokazana značajnost razlike u broju trombocita pri dijagnozi ( $t = - 0,62$ ;  $p = 0,54$ ), broju trombocita nakon 8 tjedana ( $t = 0,09$ ;  $p = 0,928$ ) i broju trombocita nakon 6 mjeseci ( $t = 0,87$ ;  $p = 0,391$ ).

U preko 50% djece trombocitopenija je bila izrazito teška do teška, dok je u ostalih zadovoljavala kriterije umjereno teške do umjerene trombocitopenije. U 26%

odraslih trombocitopenija je bila izrazito teška do teška, dok je u ostalih 74% zadovoljavala kriterije umjereno teške do umjerene trombocitopenije (tablica 5).

Tablica 5. Učestalost težine trombocitopenije u djece i odraslih

Broj trombocita	DJECA N(%)	ODRASLI N(%)	P
< 10 x 10 <sup>9</sup> /L	26(58%)	5(26%)	0,011
10.1 – 30.0 x 10 <sup>9</sup> /L	8(18%)	3(16%)	0,424
30.1 – 50.0 x 10 <sup>9</sup> /L	8(18%)	4(21%)	0,390
> 50.0 x 10 <sup>9</sup> /L	3(6%)	7(37%)	0,001
Ukupno	45(100%)	19(100%)	

U odraslih s AITP broj trombocita pri dijagnozi se statistički značajno razlikovao po spolu, tako da je u žena bio značajno niži ( $t = 2,56$ ;  $p = 0,020$ ), za razliku od broja trombocita nakon 8 tjedana ( $t = 1,24$ ;  $p = 0,244$ ) i broja trombocita nakon 6 mjeseci ( $t = 0,47$ ;  $p = 0,658$ ), gdje nije bilo statistički značajne razlike po spolu.

Bolesnici su podijeljeni na one s akutnom AITP, u kojih je broj trombocita u perifernoj krvi 6 mjeseci od dijagnoze bio veći ili jednak  $150 \times 10^9/L$ , i na bolesnike s kroničnom AITP, u kojih je broj trombocita u perifernoj krvi nakon 6 mjeseci od dijagnoze bio manji od  $150 \times 10^9/L$ .

Više je bilo muške djece (70%) nego ženske (30%) s kroničnom AITP. Nije bilo statistički značajne razlike u broju trombocita u perifernoj krvi između muške i ženske djece s kroničnom AITP ( $t = 0,35$ ;  $p = 0,736$ ). Srednje vrijednosti trombocita u muške djece su bile  $73,4 \pm 48,18 \times 10^9/L$  (minimum  $25 \times 10^9/L$ , maksimum  $149 \times 10^9/L$ ), a u ženske  $61,0 \pm 60,65 \times 10^9/L$  (minimum  $25 \times 10^9/L$ , maksimum  $149 \times 10^9/L$ ).

Analizom varijance s jednim promjenjivim faktorom nije dokazana statistički značajna razlika broja trombocita u perifernoj krvi u svih bolesnika s akutnom ( $n = 24$ ) i kroničnom AITP ( $n = 13$ ) pri dijagnozi ( $n = 37$ ) ( $F = 0,26$ ;  $p = 0,615$ ). U bolesnika s akutnom AITP srednja vrijednost broja trombocita pri dijagnozi bila je  $19,6 \pm 25,98 \times 10^9/L$  (minimum 0; maksimum  $79 \times 10^9/L$ ), a u bolesnika s kroničnom AITP bila je  $23,85 \pm 20,19 \times 10^9/L$  (minimum  $6 \times 10^9/L$ ; maksimum  $66 \times 10^9/L$ ).

Broj trombocita u perifernoj krvi nakon 8 tjedana ( $n = 36$ ), pokazivao je statistički značajnu razliku između bolesnika s akutnom i kroničnom AITP ( $F = 6,89$ ;  $p = 0,013$ ).

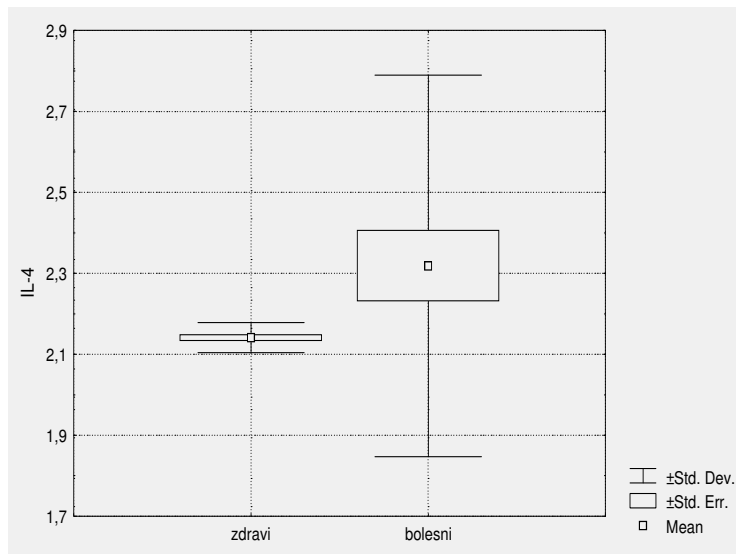
U bolesnika s akutnom AITP srednja vrijednost broja trombocita nakon 8 tjedana bila je  $198,8 \pm 116,81 \times 10^9/L$  (minimum  $41 \times 10^9/L$ ; maksimum  $463 \times 10^9/L$ ), a u bolesnika s kroničnom AITP bila je  $104,2 \pm 59,59 \times 10^9/L$  (minimum  $15 \times 10^9/L$ ; maksimum  $205 \times 10^9/L$ ). U troje bolesnika s kroničnom AITP broj trombocita nakon 8 tjedana je bio veći od  $150 \times 10^9/L$  i u njih je u razdoblju do 6 mjeseci uslijedio pad trombocita ispod  $150 \times 10^9/L$ .

U bolesnika s akutnom AITP srednja vrijednost broja trombocita nakon 6 mjeseci ( $250,1 \pm 70,71 \times 10^9/L$  (minimum  $151 \times 10^9/L$ ; maksimum  $393 \times 10^9/L$ ) je bila statistički značajno veća ( $F = 62,97$ ;  $p < 0,001$ ) nego u u bolesnika s kroničnom AITP je bila  $76,2 \pm 47,56 \times 10^9/L$  (minimum  $13 \times 10^9/L$ ; maksimum  $146 \times 10^9/L$ ).

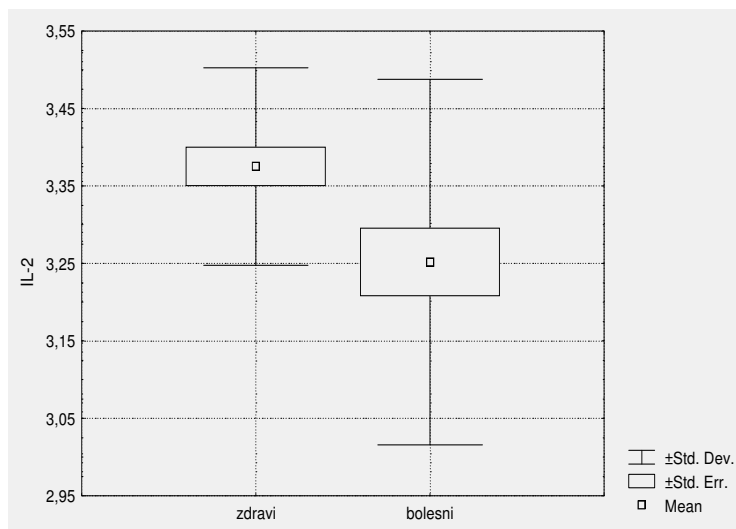
#### **4.2. Koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ u serumu djece s trombocitopenijom pri dijagnozi**

Uspoređujući serumske koncentracije odabranih citokina između zdrave djece i djece s AITP pri dijagnozi uočena je značajnost razlike u serumskim koncentracijama IL-2, IL-4 i TNF- $\alpha$  (tablica 6).

U djece s trombocitopenijom nađene su granično veće koncentracije citokina IL-4 ( $t = -1,91$ ;  $p = 0,062$ ; slika 3., tablica 6), i statistički značajno manje koncentracije citokina IL-2 (slika 4, tablica 6;  $t = 2,37$ ;  $p = 0,021$ ) i TNF- $\alpha$  (slika, tablica 6;  $t = 2,71$ ;  $p = 0,009$ ). Koncentracija ostalih citokina bila je unutar referentnih vrijednosti.

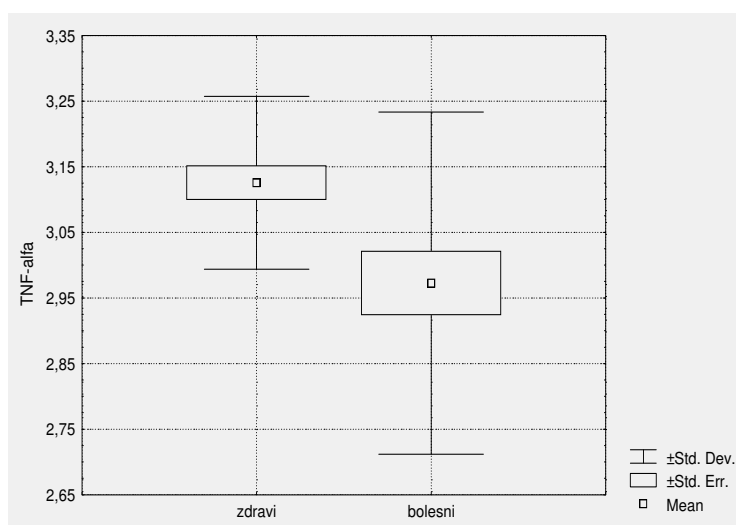


Slika 3. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, standardne pogreške (SE) i SD IL-4 u zdrave i djece s AITP pri dijagnozi



Slika 4. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-2 u zdrave i djece s AITP pri dijagnozi





Slika 5. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD TNF- $\alpha$  u zdrave i djece s AITP pri dijagnozi

Tablica 6. Prikaz razlika serumskih kocntracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  u zdrave i djece s AITP pri dijagnozi

Citokin pg/ml	Djeca	n	Mean $\pm$ SD	Min-Maks	t	p
IL-1 $\alpha$	Ispitivani	29	3,5 $\pm$ 2,76	0,0 – 9,5	- 1,48	0,146
	Kontrola	26	2,4 $\pm$ 1,42	0,1 - 4,9		
IL-2	Ispitivani	29	26,5 $\pm$ 6,25	18 - 43,5	2,37	<b>0,021</b>
	Kontrola	26	29,4 $\pm$ 3,67	18 - 43,2		
IL-3	Ispitivani	29	54,2 $\pm$ 16,77	19,5 - 83	- 0,77	0,445
	Kontrola	26	48,5 $\pm$ 9,53	40,2 - 74,2		
IL-4	Ispitivani	29	11,6 $\pm$ 7,76	7,7 - 32,5	-1,91	<b>0,062</b>
	Kontrola	26	8,5 $\pm$ 0,31	7,9 - 8,9		
IL-6	Ispitivani	29	6,1 $\pm$ 5,15	3 – 25	-1,21	0,233
	Kontrola	26	4,5 $\pm$ 0,98	3,2 - 7,1		
IL-10	Ispitivani	29	18,3 $\pm$ 6,23	8 – 34,9	0,61	0,554
	Kontrola	26	18,2 $\pm$ 2,99	16,2 - 28,8		
TNF- $\alpha$	Ispitivani	29	20,1 $\pm$ 4,83	7,9 – 30	2,71	<b>0,009</b>
	Kontrola	26	22,9 $\pm$ 3,28	19 – 33		
IFN- $\gamma$	Ispitivani	29	47,4 $\pm$ 6,42	36,2 – 63,3	0,22	0,830
	Kontrola	26	47,3 $\pm$ 2,22	44,1 – 51,2		
IFN- $\alpha$	Ispitivani	29	53,8 $\pm$ 35,35	6 - 150	-1,16	0,252
	Kontrola	26	43,6 $\pm$ 26,65	9,87 – 89		

Nije bilo statistički značajne razlike u serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$  (t = - 1,48; p = 0,146), IL-3 (t = - 0,77; p = 0,445), IL-6 (t = - 1,21; p = 0,233), IL-10 (t = 0,61; p = 0,554), IFN- $\gamma$  (t = 0,22; p = 0,830) i IFN- $\alpha$  (t = - 1,16; p = 0,252) (tablica 6).

#### 4.3. Koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ u serumu odraslih s trombocitopenijom pri dijagnozi

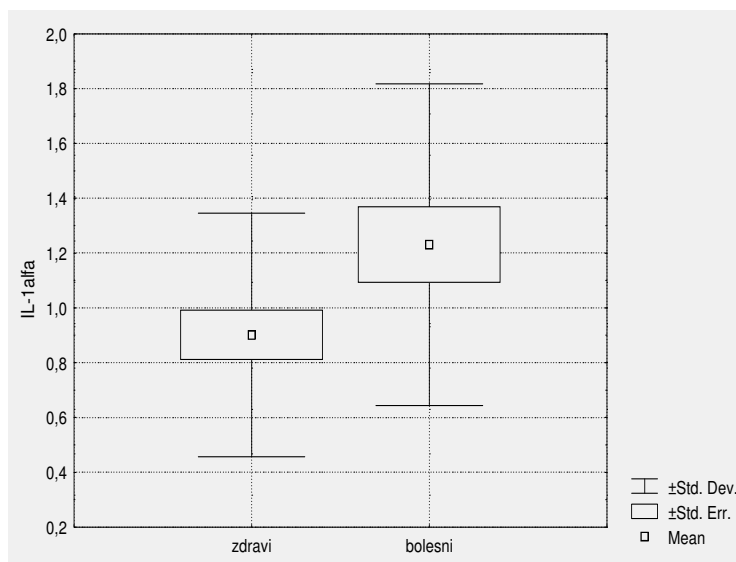
Analiza usporedbe serumskih vrijednosti citokina među skupinama izvršena je parametrijskim t-testom za nezavisne uzorke s logaritamski transformiranim varijablama. Rezultati su prikazani u tablici 7. kao srednja vrijednost  $\pm$  SD, minimum, maksimum, t i p vrijednost.

Tablica 7. Prikaz razlika serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  u odraslih s AITP pri dijagnozi i kontrolne skupine

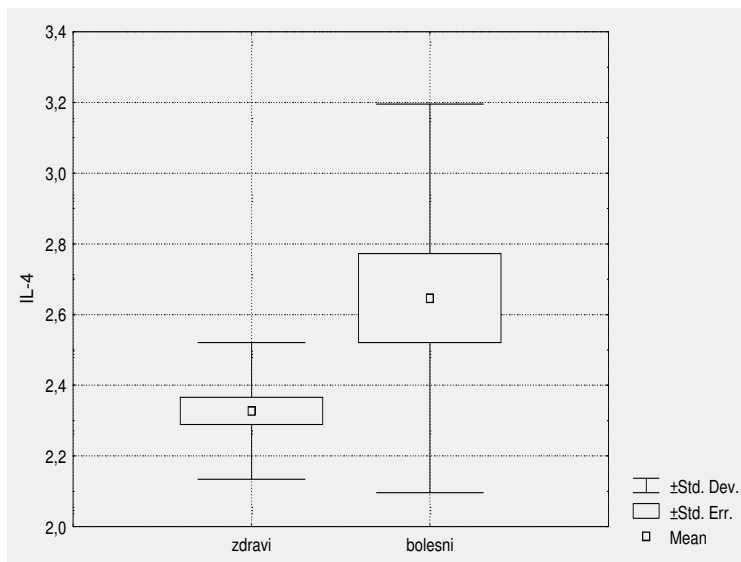
Citokin pg/ml	Odrasli	n	Mean $\pm$ SD	Min-Maks	t	p
IL-1 $\alpha$	Ispitivani	18	3,8 $\pm$ 2,66	0,0 – 11,3	- 2,07	<b>0,045</b>
	Kontrola	24	2,7 $\pm$ 1,08	1 - 5,8		
IL-2	Ispitivani	19	25,8 $\pm$ 4,13	17,5 – 31,2	0,44	0,660
	Kontrola	24	26,1 $\pm$ 2,58	17 – 31		
IL-3	Ispitivani	19	61,0 $\pm$ 27,29	24,5 – 137	1,22	0,230
	Kontrola	24	70,5 $\pm$ 29,90	31,2 – 150		
IL-4	Ispitivani	19	16,6 $\pm$ 11,31	8,1 – 48,9	- 2,65	<b>0,011</b>
	Kontrola	24	10,4 $\pm$ 2,12	7,3 - 14,9		
IL-6	Ispitivani	19	7,9 $\pm$ 2,13	3,5 – 13,5	- 0,68	0,503
	Kontrola	24	7,4 $\pm$ 1,58	3,12 - 9,54		
IL-10	Ispitivani	19	16,3 $\pm$ 3,53	9,3 – 27,5	2,11	<b>0,041</b>
	Kontrola	24	18,0 $\pm$ 2,9	14,7 - 29,8		
TNF- $\alpha$	Ispitivani	19	20,2 $\pm$ 6,41	15,7 – 41	0,70	0,494
	Kontrola	24	20,6 $\pm$ 3,32	17 - 29,4		
IFN- $\gamma$	Ispitivani	19	58,8 $\pm$ 14,31	36,3 – 82,8	- 0,97	0,336
	Kontrola	24	54,4 $\pm$ 10,7	36 - 68,3		
IFN- $\alpha$	Ispitivani	19	30,1 $\pm$ 22,47	5,3 – 87,9	- 0,62	0,537
	Kontrola	24	27,7 $\pm$ 21,47	4 – 89		

Analizom usporedbe serumskih koncentracija odabranih citokina u zdravih i odraslih s AITP pri dijagnozi uočena je značajnost razlike serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$  (t = - 2,07; p = 0,045), IL-4 (t = - 2,65; p = 0,011) i IL-10 (t = 2,11; p = 0,041). Odrasli s AITP su imali statistički značajno veće vrijednosti IL-1 $\alpha$  (slika 6) i IL-4 (slika 7), a statistički značajno manje koncentracije IL-10 (slika 8) od zdravih ispitanika.

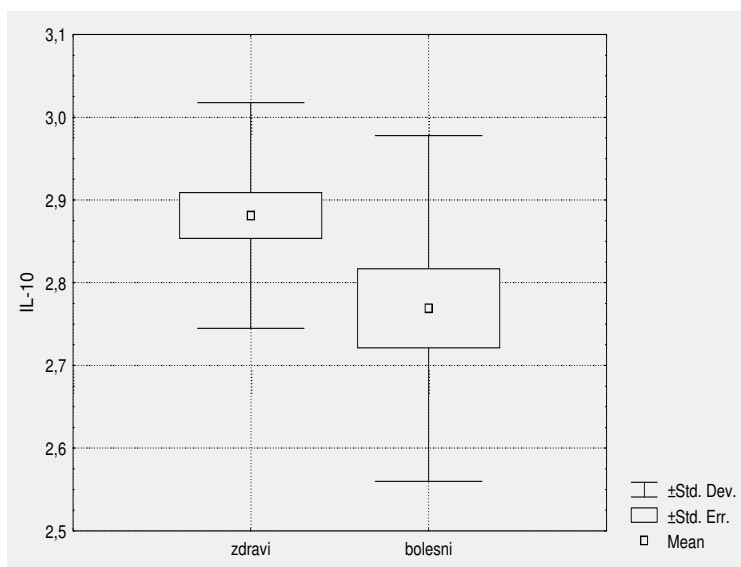
Nije bilo statistički značajne razlike u serumskim koncentracijama IL-2 (t = 0,44; p = 0,660), IL-3 (t = 1,22; p = 0,230), IL-6 (t = - 0,68; p = 0,503), TNF- $\alpha$  (t = 0,70; p = 0,494), IFN- $\gamma$  (t = - 0,97; p = 0,336) i IFN- $\alpha$  (t = - 0,62; p = 0,537) (tablica 7).



Slika 6. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-1 $\alpha$  u zdravih i odraslih s AITP pri dijagnozi



Slika 7. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-4 u zdravih i odraslih s AITP pri dijagnozi



Slika 8. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-10 u zdravih i odraslih s AITP pri dijagnozi

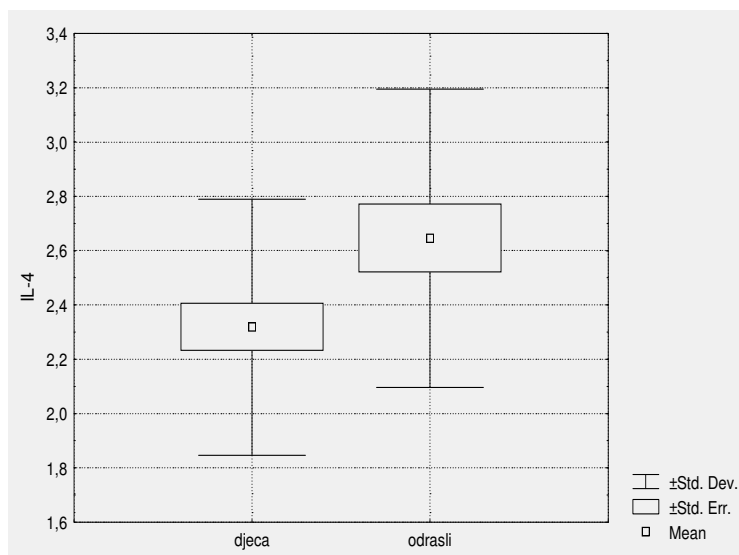
#### 4.4. Koncentracije citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ i njihove razlike u djece i odraslih s trombocitopenijom pri dijagnozi

Koncentracije citokina pri dijagnozi i njihove razlike u djece i odraslih prikazuje tablica 8. Dokazana je statistički značajna razlika u serumskim koncentracijama IL-4 ( $t = -2,20$ ;  $p = 0,033$ ), IL-6 ( $t = -3,01$ ;  $p = 0,004$ ), IFN- $\gamma$  ( $t = -3,46$ ;  $p = 0,001$ ) i IFN- $\alpha$  ( $t = 2,81$ ;  $p = 0,007$ ).

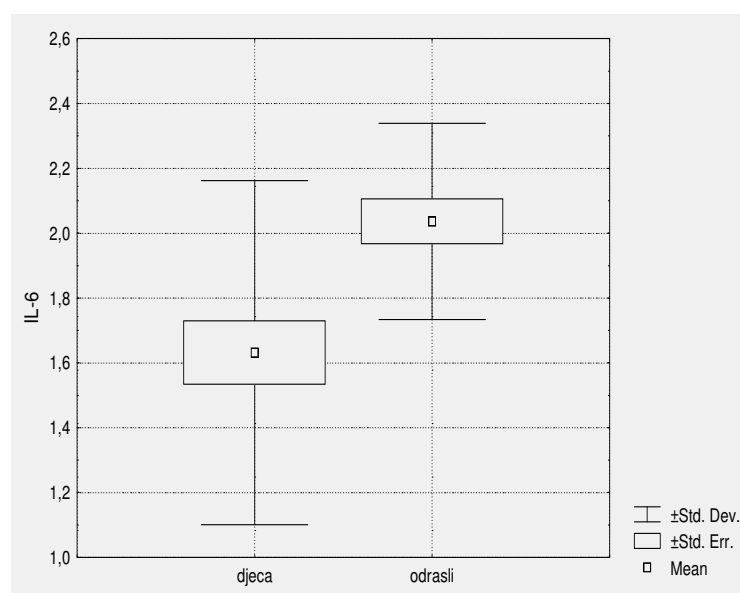
Djeca s AITP su imala statistički značajno manje koncentracije IL-4 (slika 9), IL-6 (slika 10) i IFN- $\gamma$  (slika 11), a statistički značajno veće koncentracije IFN- $\alpha$  (slika 12). Nije bilo statistički značajne razlike u serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$  ( $t = -0,79$ ;  $p = 0,432$ ), IL-2 ( $t = 0,21$ ;  $p = 0,838$ ), IL-3 ( $t = -0,73$ ;  $p = 0,468$ ), IL-10 ( $t = 0,97$ ;  $p = 0,338$ ) i TNF- $\alpha$  ( $t = 0,02$ ;  $p = 0,987$ ) (tablica 8).

Tablica 8. Prikaz razlika serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi

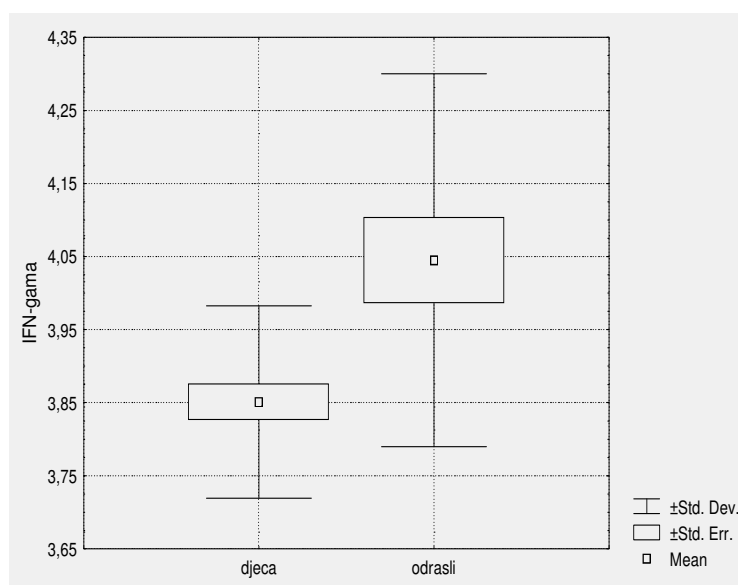
Citokin pg/ml	Bolesni	n	Mean $\pm$ SD	Min-Maks	t	p
IL-1 $\alpha$	Djeca	29	3,5 $\pm$ 2,76	0,0 – 9,5	- 0,79	0,432
	Odrasli	19	3,8 $\pm$ 2,66	0,0 – 11,3		
IL-2	Djeca	29	26,5 $\pm$ 6,25	18 - 43,5	0,21	0,838
	Odrasli	19	25,8 $\pm$ 4,13	17,5 – 31,2		
IL-3	Djeca	29	54,2 $\pm$ 16,77	19,5 - 83	- 0,73	0,468
	Odrasli	19	61,0 $\pm$ 27,29	24,5 – 137		
IL-4	Djeca	29	11,6 $\pm$ 7,77	7,7 - 32,5	- 2,20	0,033
	Odrasli	19	16,6 $\pm$ 11,3	8,1 – 48,9		
IL-6	Djeca	29	6,1 $\pm$ 5,15	3 – 25	- 3,01	0,004
	Odrasli	19	7,9 $\pm$ 2,13	3,5 – 13,5		
IL-10	Djeca	29	18,3 $\pm$ 6,23	8 – 34,9	0,97	0,338
	Odrasli	19	16,3 $\pm$ 3,53	9,3 – 27,5		
TNF- $\alpha$	Djeca	29	20,1 $\pm$ 4,83	7,9 – 30	0,02	0,987
	Odrasli	19	20,2 $\pm$ 6,41	15,7 – 41		
IFN- $\gamma$	Djeca	29	47,4 $\pm$ 6,42	36,2 – 63,3	- 3,46	0,001
	Odrasli	19	58,8 $\pm$ 14,31	36,3 – 82,8		
IFN- $\alpha$	Djeca	29	53,8 $\pm$ 35,35	6 - 150	2,81	0,007
	Odrasli	19	30,1 $\pm$ 22,47	5,3 – 87,9		



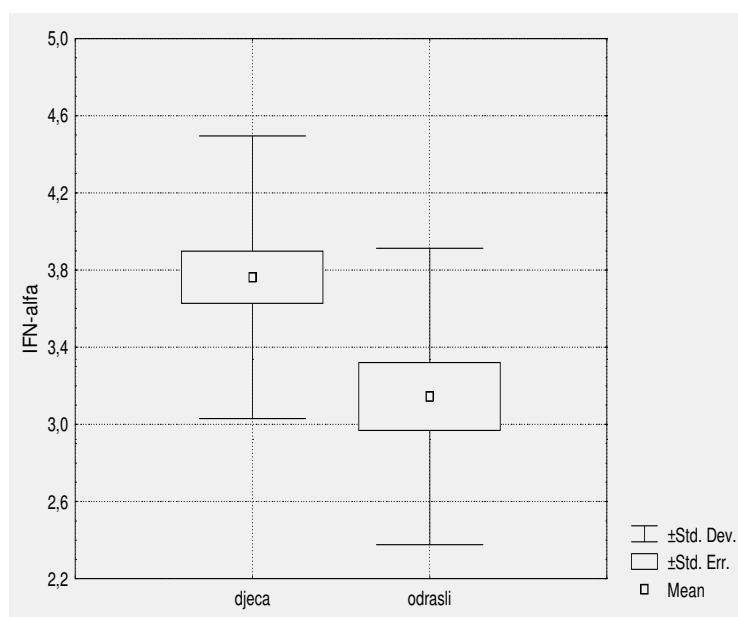
Slika 9. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-4 u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi



Slika 10. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-6 u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi



Slika 11. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IFN- $\gamma$  u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi



Slika 12. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IFN- $\alpha$  u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi

#### **4.5. Povezanost serumskih koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ s apsolutnim brojem limfocita, postotkom cirkulirajućih limfocita T, B, T4, T8 i NK stanica u djece i odraslih s trombocitopenijom pri dijagnozi**

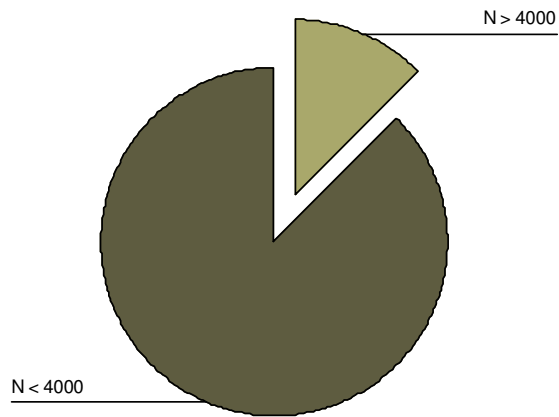
Analiza apsolutnog broja limfocita (n = 29), postotka cirkulirajućih limfocita T (n = 33), B (n = 33), T4 (n = 34), T8 (n = 34) i NK stanica (n = 32) u perifernoj krvi djece i odraslih s AITP, te njihova povezanost sa serumskim koncentracijama citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  u sva tri mjerenja (/1, /2, /3) zajedno prikazani su u tablici 9.

Apsolutni broj limfocita ispod 4000/ $\mu$ L imalo je 25 (86%) od 29 oboljelih od AITP - 14 (87,5%) od 16 djece i 11 (84,5%) od 13 odraslih. U djece i odraslih apsolutni broj limfocita u perifernoj krvi je u visokom postotku bio ispod granice normale pri dijagnozi (slika 13). Postotak cirkulirajućih limfocita T u perifernoj krvi ispod granice normale imalo je jedno dijete s AITP (5%) od ukupno 18 djece, dok je u 17 (95%) djece postotak bio u granicama normale.

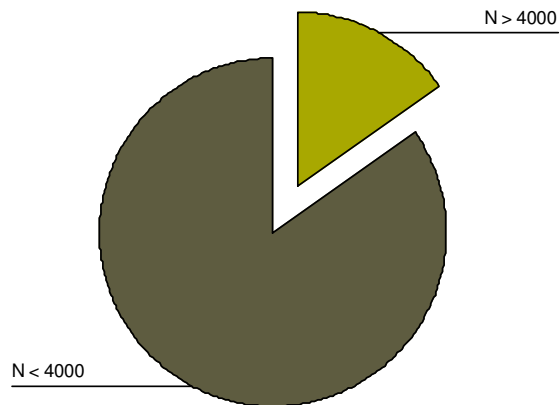
U odraslih jedan (6,6%) je imao postotak cirkulirajućih limfocita T ispod granice normale, jedan (6,6%) iznad granice normale, dok je u njih 13 (86,8%) ovaj postotak bio u granicama normale. U četvero djece (22%) postotak cirkulirajućih limfocita B je bio iznad granice normale dok je u njih 14 (78%) bio u granicama normale. U odraslih 2 (13,3%) je imalo postotak cirkulirajućih limfocita B ispod granica normale, a 13 (86,7%) u granicama normale.



Djeca s AITP  
Apsolutni broj limfocita

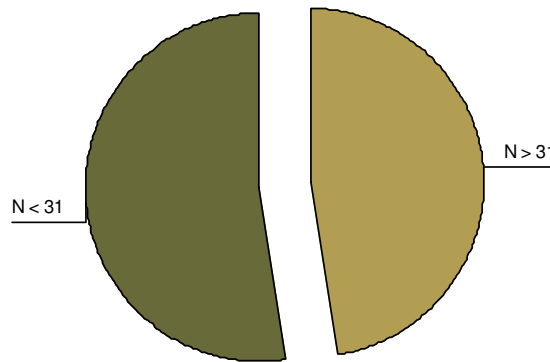


Odrasli s AITP  
Apsolutni broj limfocita

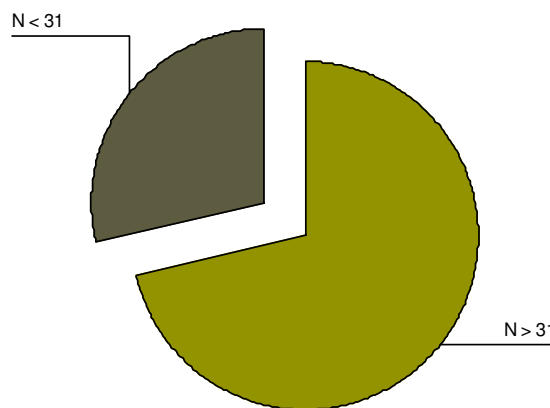


Slika 13. Prikaz apsolutnog broja limfocita u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi

Djeca s AITP  
Postotak cirkulirajućih limfocita T4



Odrasli s AITP  
Postotak cirkulirajućih limfocita T4



Slika 14. Prikaz postotka cirkulirajućih limfocita T4 u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi

Postotak cirkulirajućih limfocita T4 u 10 (52,6%) djece i u 4 (27,6%) odrasla je bio ispod granice normale, dok je u 9 (47,4%) djece i u 11 (72,4%) odraslih bio u

granicama normale. U djece s AITP postotak cirkulirajućih limfocita T4 je u značajnom postotku bio ispod granica normale pri dijagnozi, za razliku od odraslih u kojih je taj postotak, u odnosu na djecu, bio nešto niži (slika 14). Postotak cirkulirajućih limfocita T8 u dvoje djece s AITP (10,5%) je bio iznad granice normale, dok je u 17 (89,5%) bio u granicama normale. U odraslih jedan (6,6%) je imao postotak cirkulirajućih limfocita T8 ispod granice normale, jedan (6,6%) iznad granice normale, dok je njih 13 (86,8%) isti postotak imalo u granicama normale.

Postotak cirkulirajućih NK stanica ispod normale imalo je jedno dijete s AITP (5,8%), dok je u njih 16 (94,2%) taj postotak bio u granicama normale. U 2 (13,3%) odrasla je postotak cirkulirajućih NK stanica bio ispod granica normale, u 1 (6,6%) iznad granica normale, dok je u njih 11 (73,3%) taj postotak bio u granicama normale.

Razlike imunoloških parametara: apsolutnog broja limfocita, postotka cirkulirajućih limfocita T, B, T4, T8 i NK stanica pri dijagnozi između djece i odraslih s AITP ispitane su student t-testom za nezavisne uzorke (tablica 9).

Nije bilo statistički značajne razlike u apsolutnom broju limfocita u perifernoj krvi ( $t = 1,59$ ;  $p = 0,123$ ). Apsolutni broj limfocita u djece s AITP iznosio je  $2810,2 \pm 1248,89/\mu\text{L}$  (medijan:  $2509/\mu\text{L}$ ; minimum  $1460/\mu\text{L}$ ; maksimum  $5772/\mu\text{L}$ ), a u odraslih  $2110,2 \pm 1081,43/\mu\text{L}$  (medijan:  $1992/\mu\text{L}$ ; minimum  $759/\mu\text{L}$ ; maksimum  $4430/\mu\text{L}$ ).

Nije bilo statistički značajne razlike u postotku cirkulirajućih limfocita T ( $t = 0,20$ ;  $p = 0,984$ ), koji je u djece s AITP iznosio  $65,6 \pm 9,59\%$  (medijan  $66\%$ ; minimum  $42\%$ ; maksimum  $82\%$ ), a u odraslih  $65,5 \pm 12,67\%$  (medijan  $66\%$ ; minimum  $27\%$ ; maksimum  $86\%$ ).

Nije bilo statistički značajne razlike u postotku cirkulirajućih limfocita B djece i odraslih s AITP ( $t = 0,68$ ;  $p = 0,503$ ). U djece postotak cirkulirajućih limfocita B je iznosio  $20,2 \pm 8,71\%$  (medijan  $22\%$ ; minimum  $7\%$ ; maksimum  $43\%$ ), a u odraslih  $17,3 \pm 15,51\%$  (medijan  $14\%$ ; minimum  $6\%$ ; maksimum  $68\%$ ).

Dokazana je statistički značajna razlika u postotku cirkulirajućih limfocita T4 ( $t = -1,97$ ;  $p = 0,057$ ), koji je u djece s AITP iznosio je  $32,5 \pm 7,65\%$  (medijan  $30\%$ ; minimum  $19\%$ ; maksimum  $48\%$ ), a u odraslih  $39,5 \pm 12,91\%$  (medijan  $43\%$ ; minimum  $17\%$ ; maksimum  $60\%$ ). **Postotak cirkulirajućih limfocita T4 u djece je bio statistički značajno niži.**

Između ispitivanih skupina nije bilo statistički značajne razlike u postotku cirkulirajućih limfocita T8 ( $t = 0,62$ ;  $p = 0,540$ ), koji je u djece s AITP iznosio  $28,3 \pm 9,69\%$  (medijan 24%; minimum 16%; maksimum 51%), a u odraslih  $26,3 \pm 8,69\%$  (medijan 25%; minimum 9%; maksimum 43%).

Nije bilo statistički značajne razlike u postotku cirkulirajućih NK stanica između djece i odraslih s AITP ( $t = -0,81$ ;  $p = 0,423$ ), jer je postotak cirkulirajućih NK stanica u djece s AITP iznosio  $13,4 \pm 5,36\%$  (medijan 13%; minimum 4%; maksimum 24%), a u odraslih  $15,5 \pm 9,49\%$  (medijan 16%; minimum 3%; maksimum 33%).

U djece postotak cirkulirajućih limfocita T je pokazivao statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$ /1 ( $r = 0,46$ ;  $p = 0,098$ ) i IL-1 $\alpha$ /2 ( $r = 0,48$ ;  $p = 0,081$ ). Vrijednosti limfocita B su pokazivale statistički značajno negativnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-6/3 ( $r = -0,88$ ;  $p = 0,021$ ), IL-10/3 ( $r = -0,91$ ;  $p = 0,013$ ). Postotak limfocita T4 je pokazivao statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$ /1 ( $r = 0,54$ ;  $p = 0,036$ ). U djece su vrijednosti limfocita T8 pokazivale statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-4/3 ( $r = 0,68$ ;  $p = 0,094$ ). Vrijednosti NK stanica su pokazivale statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-2/1 ( $r = 0,55$ ;  $p = 0,052$ ), IL-10/3 ( $r = 0,78$ ;  $p = 0,066$ ), TNF- $\alpha$ /2 ( $r = 0,49$ ;  $p = 0,092$ ) i IL-6/3 ( $r = 0,81$ ;  $p = 0,057$ ), a statistički značajno negativnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$ /1 ( $r = -0,49$ ;  $p = 0,089$ ).

U odraslih su limfociti T pokazivali statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-3/1 ( $r = 0,51$ ;  $p = 0,054$ ) i IL-10/2 ( $r = 0,70$ ;  $p = 0,024$ ). Cirkulirajući limfociti B su pokazivali statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-4/3 ( $r = 0,94$ ;  $p = 0,005$ ), a statistički značajno negativnu sa serumskim koncentracijama IFN- $\gamma$ /2 ( $r = -0,71$ ;  $p = 0,020$ ). Postotak cirkulirajućih limfocita T4 je pokazivao statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-10/2 ( $r = 0,57$ ;  $p = 0,082$ ). Vrijednosti NK stanica su pokazivale statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IFN- $\gamma$ /2 ( $r = 0,56$ ;  $p = 0,095$ ), IFN- $\gamma$ /3 ( $r = 0,78$ ;  $p = 0,070$ ) i IFN- $\alpha$ /3 ( $r = 0,84$ ;  $p = 0,036$ ).

Tablica 9. Prikaz razlika apsolutnog broja limfocita, postotka cirkulirajućih limfocita T, B, T4, T8 i NK stanica pri dijagnozi u perifernoj krvi djece i odraslih s AITP

Limfociti	n	Ispitanici	Mean $\pm$ SD	Min-Maks	t	p
Apsolutni broj / $\mu$ L	16	Djeca	2810,2 $\pm$ 1248,9	1460 – 5772	1,59	0,123
	13	Odrasli	2110,2 $\pm$ 1081,4	759 – 4430		
T (%)	18	Djeca	65,1 $\pm$ 9,5	42 – 82	0,20	0,984
	15	Odrasli	65,5 $\pm$ 12,7	27 – 86		
B (%)	18	Djeca	20,2 $\pm$ 8,7	7 – 43	0,68	0,503
	15	Odrasli	17,3 $\pm$ 15,5	6 – 68		
T4 (%)	19	Djeca	32,5 $\pm$ 7,6	19 – 48	- 1,97	<b>0,057</b>
	15	Odrasli	39,5 $\pm$ 12,9	17 – 60		
T8 (%)	19	Djeca	28,3 $\pm$ 9,7	16 – 51	0,62	0,540
	15	Odrasli	26,3 $\pm$ 8,7	9 – 43		
NK (%)	17	Djeca	13,4 $\pm$ 5,4	4 – 24	- 0,81	0,423
	15	Odrasli	15,5 $\pm$ 9,5	3 – 33		

Analizirajući Pearsonovim testom korelacije povezanost između apsolutnog broja limfocita, postotka cirkulirajućih limfocita T, B, T4, T8 i NK stanica pri dijagnozi s brojem trombocita u perifernoj krvi u sva tri mjerenja u djece nije dokazana statistički značajna povezanost među varijablama (tablica 10).

U odraslih bolesnika broj trombocita u perifernoj krvi pri dijagnozi nije bio statistički značajno povezan s postotkom cirkulirajućih limfocita T i T4, ali je bio statistički značajno pozitivno povezan s postotkom cirkulirajućih limfocita B ( $r = 0,49$ ,  $p = 0,065$ ), T8 ( $r = 0,49$ ;  $p = 0,064$ ) i NK stanica ( $r = 0,45$ ;  $p = 0,096$ ).

Dokazana je statistički značajna negativna povezanost između apsolutnog broja limfocita i broja trombocita pri dijagnozi ( $r = - 0,75$ ;  $p = 0,003$ ) (slika 15) i statistički značajna negativna povezanost postotka cirkulirajućih NK stanica pri dijagnozi i broja trombocita nakon 8 tjedana ( $r = - 0,66$ ;  $p = 0,039$ ) (tablica 10).

Tablica 10. Prikaz povezanosti apsolutnog broja limfocita, postotka cirkulirajućih limfocita T, B, T4, T8 i NK stanica s brojem trombocita u djece i odraslih s AITP

Djeca							
Trombociti	Korelacija	Apsolutni broj limfocita	Limfociti T	Limfociti B	Limfociti T4	Limfociti T8	NK stanice
Pri dijagnozi	r	- 0,13	0,27	- 0,14	0,26	0,24	- 0,30
	p	0,628	0,285	0,570	0,288	0,329	0,242
	n	16	18	18	19	19	17
8 tjedan	r	- 0,06	0,19	- 0,24	0,09	0,000	0,01
	p	0,852	0,506	0,391	0,746	0,999	0,973
	n	13	15	15	16	16	14
6 mjeseci	r	0,22	0,37	- 0,24	0,45	0,18	- 0,27
	p	0,509	0,207	0,433	0,108	0,550	0,399
	n	11	13	13	14	14	12
Odrasli							
Pri dijagnozi	r	<b>- 0,75</b>	0,21	<b>0,49</b>	- 0,08	<b>0,49</b>	<b>0,45</b>
	p	<b>0,003</b>	0,457	<b>0,065</b>	0,771	<b>0,064</b>	<b>0,096</b>
	n	13	15	15	15	15	15
8 tjedan	r	0,57	0,28	0,10	0,42	- 0,03	<b>- 0,66</b>
	p	0,108	0,434	0,786	0,229	0,937	<b>0,039</b>
	n	9	10	10	10	10	10
6 mjeseci	r	0,48	0,05	0,64	0,232	- 0,12	- 0,69
	p	0,411	0,921	0,168	0,658	0,827	0,132
	n	5	6	6	6	6	6



Slika 15. Prikaz negativne povezanosti broja trombocita i apsolutnog broja limfocita u perifernoj krvi u odraslih s AITP pri dijagnozi

#### **4.6. Povezanost serumskih koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ s prisustvom serumskih IgM i IgG protutijela na CMV, EBV, HHV-6, adenovirus i parvovirus B19 u djece i odraslih s trombocitopenijom pri dijagnozi**

Serumske vrijednosti IgM i IgG protutijela na CMV, EBV, HHV-6, adenovirus i parvovirus B19 određene su u 56 bolesnika, 39 djece i 17 odraslih s AITP, a rezultati prikazani u tablici 11.

Pozitivna IgM serumska protutijela na bilo koji od odabranih virusa imalo je 33 (59%) bolesnika (slika 16). Sveukupno je bilo 7 (12%) bolesnika, koji su imali pozitivna IgM serumska protutijela istovremeno na dva ili više virusa.

Prisustvo serumskih IgM i IgG protutijela na CMV analizirano je u 56 bolesnika, 39 djece i 17 odraslih i prikazano u tablici 11. Negativna serumska CMV IgM protutijela imalo je 55 bolesnika (98%), 38 (97,4%) djece i 17 (100%) odraslih. Od svih bolesnika samo je jedno dijete (2%) imalo serumska CMV IgM protutijela pozitivna (slika 16). Pozitivna serumska CMV IgG protutijela imalo je 42 (75%) bolesnika, 28 (72%) djece i 14 (82%) odraslih. Negativna protutijela imalo je 11 (28%) djece i 3 (17,6%) odrasla. Nije bilo statistički značajne razlike učestalosti pozitivnih CMV IgG serumskih protutijela u djece i odraslih s AITP ( $\chi^2 = 0,7$ ;  $p = 0,4$ ).

Serumska protutijela na EBV (EBV EA IgM, EBV EA IgG, EBV VCA IgM, EBV VCA IgG, EBNA IgG) analizirana su u 56 bolesnika, 39 djece i 17 odraslih i prikazala u tablici 11. Serološki potvrđenu akutnu EBV infekciju imalo je 9 (16%) djece i odraslih s AITP (slika 16).

EBV EA IgM serumska protutijela dokazana su u 6 (11%), a u 50 (89%) djece i odraslih s AITP nisu. EBV EA IgM pozitivna serumske protutijela imalo je četvero djece i dvoje odraslih, a negativna 35 (90%) djece i 15 (88,2%) odraslih. EBV EA IgG serumska protutijela su u 51(91%) djece i odraslih s AITP bila negativna, a u 5 (9%) pozitivna. Serumska EBV EA IgG protutijela je imalo dvoje djece i 3 odrasla s AITP.

Serumska EBV VCA IgM protutijela su u 53 (95%) bolesnika, od toga u 37 (94,9%) djece i 16 (94%) odraslih s AITP bila negativna. Troje je bilo pozitivno, od toga dvoje djece i jedan odrasli. EBV VCA IgG serumska protutijela su u 36 (64%) bolesnika

bila pozitivna, od toga 22 (56%) djeteta i 14 (82%) odraslih s AITP. Serumska EBV VCA IgG protutijela su u odraslih bila češće pozitivna ( $\chi^2 = 3,5$ ;  $p = 0,062$ ).

EBNA IgG negativno bilo je 17 (44%) djece s AITP, a svega 1 (6%) odraslih s AITP. EBNA IgG serumska protutijela su u 38 (68%) bolesnika bila pozitivna, od toga 22 (56%) djeteta i 16 (94%) odraslih. Djeca s AITP su češće imala serumska EBNA IgG protutijela negativna nego odrasli ( $\chi^2 = 7,7$ ;  $p = 0,005$ ).

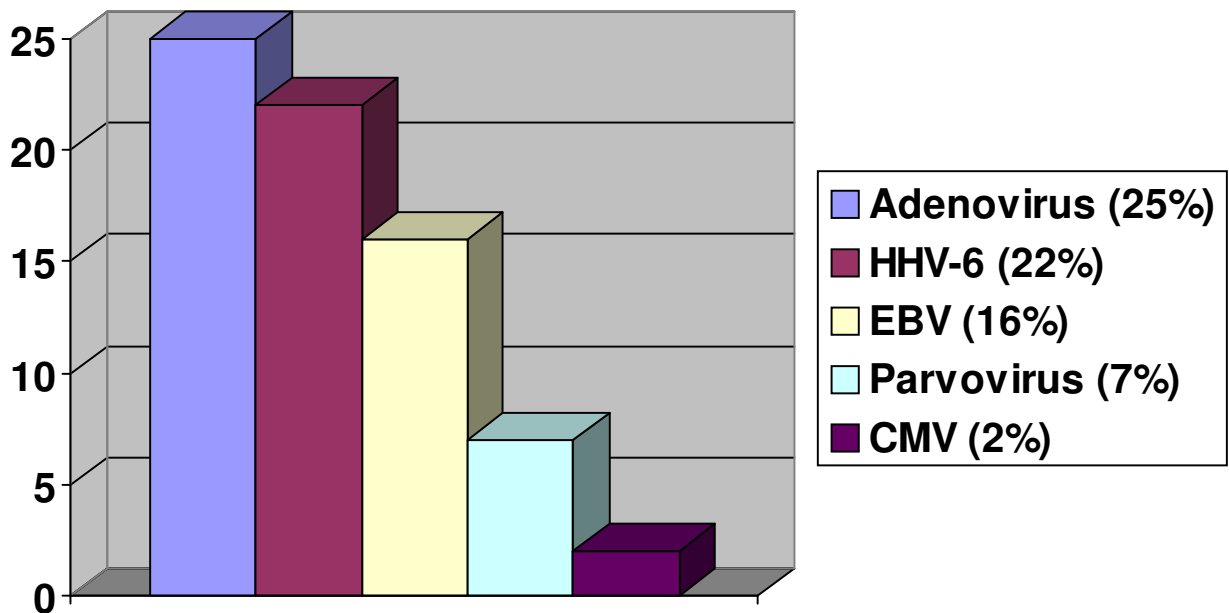
Serumska IgG protutijela na HHV-6 analizirana su u 56 bolesnika, 39 djece i 17 odraslih. Pozitivna HHV-6 IgG protutijela imalo je 49 (87,5%) bolesnika, 33 (85%) djece i 16 (94%) odraslih. Negativna HHV-6 IgG protutijela imalo je 7 (12,5%) bolesnika (6 djece i jedan odrasli). Od ukupno 49 bolesnika koji su imali pozitivna serumska HHV-6 IgG protutijela u njih 11 (22%), 8 (20%) djece i 3 (17%) odrasla, vrijednosti HHV-6 IgG serumskih protutijela su bile tri puta veće od granice normale što je ukazivalo na akutnu HHV-6 infekciju (slika 16). Nije bilo statistički značajne razlike učestalosti akutne HHV-6 infekcije između djece i odraslih s AITP ( $\chi^2 = 0,42$ ;  $p = 0,838$ ).

Tablica 11. Prikaz serumskih protutijela na CMV, EBV, HHV-6, adenovirus i parvovirus B19 u djece s AITP, odraslih i ukupno pri dijagnozi

Virus	Svi bolesnici		Djeca		Odrasli	
	pozitivna	negativna	pozitivna	negativna	pozitivna	negativna
CMV IgM	<b>1 (2%)</b>	55 (98%)	1(3%)	38 (97%)	0	17(100%)
CMV IgG	42 (75%)	14(25%)	28 (72%)	11 (28%)	14 (82%)	3 (18%)
EBV EA IgM	<b>6 (11%)</b>	50 (89%)	<b>4 (10%)</b>	34 (90%)	<b>2 (12%)</b>	15 (88%)
EBV EA IgG	<b>5 (9%)</b>	51 (91%)	<b>2 (5%)</b>	37 (95%)	<b>3 (18%)</b>	14 (82%)
EBV VCA IgM	<b>3 (5%)</b>	53 (95%)	<b>2 (5%)</b>	37(94%)	<b>1 (6%)</b>	16(94%)
EBV VCA IgG	36(64%)	20 (36%)	22(56%)	17 (44%)	14 (82%).	3 (18%)
EBNA IgG	38(68%)	18 (32%)	22(56%)	17 (44%)	16 (94%).	1 (6%)
HHV-6 IgG	49 (87%)	7 (13%)	33 (85%)	6 (15%)	16 (94%)	1 (6%)
Adenovirus IgM	<b>14 (25%)</b>	42 (75%)	<b>11(28%)</b>	28 (72%)	<b>3 (18%)</b>	14 (82%)
Adenovirus IgG	52 (93%)	4 (7%)	35(90%)	4 (10%)	17 (100%)	0
Parvovirus B19 IgM	<b>4 (7%)</b>	52 (93%)	<b>3 (8%)</b>	36 (92%)	<b>1 (6%)</b>	16 (94%)
Parvovirus B19 IgG	20 (36%)	36 (64%)	9 (23%)	30 (77%)	17 (100%)	0



Serumska IgM i IgG protutijela na adenovirus analizirana su u 56 bolesnika, 39 djece i 17 odraslih s AITP. Serumska adenovirus IgM protutijela dokazana su u 14 (25%) bolesnika (slika 16), od toga 11 (28%) djece i 3 (18%) odrasla s AITP. Adenovirus IgM serumska protutijela nisu dokazana u 42 (75%) bolesnika, 28 (72%) djece i 14 (82%) odraslih. Nije bilo statistički značajne razlike u pozitivnosti serumskih adenovirus IgM protutijela između djece i odraslih s AITP ( $\chi^2 = 0,71$ ;  $p = 0,401$ ). Serumska adenovirus IgG protutijela dokazana su u 52 (93%) bolesnika, 35 (89,7%) djece i 17 (100%) odraslih, za razliku od četvero djece s AITP u koje su bila negativna.



Slika 16. Prikaz postotka bolesnika s AITP sa serološki dokazanom akutnom virusnom infekcijom pri dijagnozi

Serumska IgM i IgG protutijela na parvovirus B19 analizirana su u 56 bolesnika, 39 djece i 17 odraslih. Parvovirus B19 IgM su bila negativna u 52 (93%) bolesnika, 36 (92%) djece i 16 (94%) odraslih, a pozitivna u troje djece i jednog odraslog (7%) (slika 16). Serumska parvovirus B19 IgG pozitivna protutijela imalo je 20 (36%) ispitanika, od toga 9 (23%) djece i 11 (65%) odraslih. Odrasli s AITP su statistički značajno češće bili parvovirus B19 IgG pozitivni od djece ( $\chi^2 = 8,9$ ;  $p = 0,003$ ).

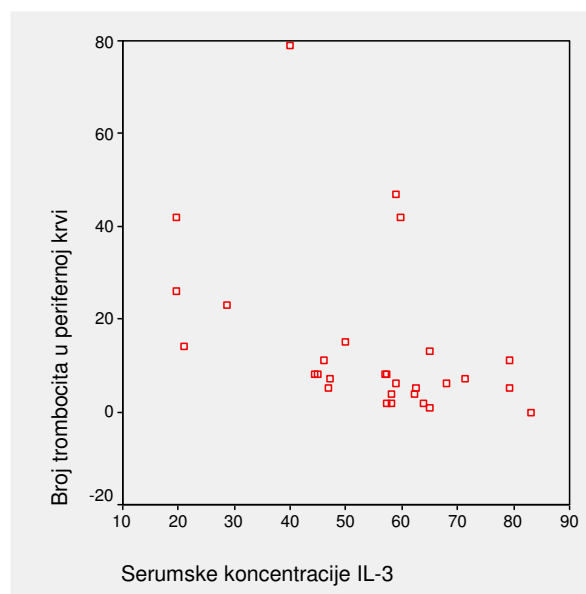
**U djece** serumska CMV IgG protutijela pokazivala su statistički značajno negativnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-2/1 ( $r = -0,35$ ;  $p = 0,062$ ), IL-10/3 ( $r = -0,96$ ;  $p < 0,001$ ) i IFN- $\gamma$ /1 ( $r = -0,33$ ;  $p = 0,077$ ). Serumska EBV EA IgM protutijela pokazivala su statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-10/1 ( $r = 0,35$ ;  $p = 0,060$ ), IFN- $\gamma$ /1 ( $r = 0,33$ ;  $p = 0,080$ ), IFN- $\alpha$ /1 ( $r = 0,35$ ;  $p = 0,066$ ) i IFN- $\alpha$ /2 ( $r = 0,33$ ;  $p = 0,082$ ). Serumska EBV EA IgG protutijela pokazivala su statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-4/2 ( $r = 0,36$ ;  $p = 0,059$ ), a negativnu s TNF- $\alpha$ /1 ( $r = -0,49$ ;  $p = 0,007$ ) i TNF- $\alpha$ /2 ( $r = -0,43$ ;  $p = 0,020$ ). Statistički značajna pozitivna povezanost uočena je između EBV VCA IgM serumskih protutijela i serumskih koncentracija IL-4/2 ( $r = 0,36$ ;  $p = 0,059$ ), a negativna sa serumskim koncentracijama TNF- $\alpha$ /1 ( $r = -0,49$ ;  $p = 0,007$ ) i TNF- $\alpha$ /2 ( $r = -0,43$ ;  $p = 0,020$ ). Serumska EBV VCA IgG protutijela pokazivala su statistički značajno negativnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-6/1 ( $r = -0,32$ ;  $p = 0,092$ ) i TNF- $\alpha$ /2 ( $r = -0,33$ ;  $p = 0,079$ ). EBNA IgG serumska protutijela pokazivala su statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-3/1 ( $r = 0,39$ ;  $p = 0,038$ ), IL-3/2 ( $r = 0,38$ ;  $p = 0,044$ ) i IFN- $\alpha$ /1 ( $r = 0,42$ ;  $p = 0,025$ ), a statistički značajno negativnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-1  $\alpha$ /1 ( $r = -0,43$ ;  $p = 0,020$ ), IL-4/1 ( $r = -0,37$ ;  $p = 0,046$ ), IL-4/2 ( $r = -0,44$ ;  $p = 0,017$ ), IL-6/1 ( $r = -0,43$ ;  $p = 0,020$ ), IL-6/2 ( $r = -0,37$ ;  $p = 0,047$ ) i IFN- $\gamma$  /1 ( $r = -0,33$ ;  $p = 0,080$ ). HHV-6 IgG serumska protutijela pokazivala su statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-10/3 ( $r = 0,54$ ;  $p = 0,089$ ). Serumska adenovirus IgM protutijela pokazivala su statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-2/1 ( $r = 0,51$ ;  $p = 0,005$ ), IL-10/3 ( $r = 0,96$ ;  $p < 0,001$ ) i IFN- $\alpha$ /1 ( $r = 0,33$ ;  $p = 0,079$ ), a negativnu s IL-1 $\alpha$ /1 ( $r = -0,49$ ;  $p = 0,007$ ). Serumska adenovirus IgG protutijela pokazivala su statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$ /3 ( $r = 0,69$ ;  $p = 0,018$ ), a negativnu s IL-10/2 ( $r = -0,43$ ;  $p = 0,021$ ). Statistički značajno pozitivnu povezanost pokazivala su serumska parvovirus B19 IgM protutijela sa serumskim koncentracijama TNF- $\alpha$ /2 ( $r = 0,35$ ;  $p = 0,063$ ), dok su serumska parvovirus B19 IgG protutijela pokazivala značajnu pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-6/3 ( $r = 0,90$ ;  $p < 0,01$ ), a negativnu s IL-2/2 ( $r = -0,31$ ;  $p = 0,099$ ) i IL-2/3 ( $r = -0,61$ ;  $p = 0,047$ ).

U **odraslih** s AITP dokazana je statistički značajna negativna povezanost serumskih CMV IgG protutijela i serumskih koncentracija IL-10/1 ( $r = -0,53$ ;  $p = 0,027$ ), IL-4/2 ( $r = -0,59$ ;  $p = 0,045$ ) i IL-4/3 ( $r = -0,996$ ;  $p < 0,01$ ). Serumski protutijela EBV EA IgM pokazivala su statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama TNF- $\alpha$ /3 ( $r = 0,91$ ;  $p = 0,004$ ) i IFN- $\gamma$ /2 ( $r = 0,52$ ;  $p = 0,081$ ), a EBV EA IgG s TNF- $\alpha$ /3 ( $r = 0,91$ ;  $p = 0,004$ ) i IFN- $\gamma$ /2 ( $r = 0,52$ ;  $p = 0,081$ ). Serumski protutijela EBV VCA IgM pokazivala su statistički značajno negativnu povezanost s IL-2/3 ( $r = -0,78$ ;  $p = 0,038$ ), IL-6/1 ( $r = -0,46$ ;  $p = 0,065$ ) i pozitivno s IFN- $\alpha$ /1 ( $r = 0,66$ ;  $p = 0,004$ ) i IFN- $\alpha$ /2 ( $r = 0,56$ ;  $p = 0,057$ ). Serumski protutijela EBV VCA IgG pokazivala su statistički značajno negativnu povezanost sa serumskim koncentracijama TNF- $\alpha$ /2 ( $r = -0,75$ ;  $p = 0,005$ ). Serumski protutijela EBNA IgG pokazivala su statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL- $\alpha$ /2 ( $r = 0,51$ ;  $p = 0,091$ ) i IL-6/1 ( $r = 0,51$ ;  $p = 0,035$ ). Serumski protutijela IgG na HHV-6 pokazivala su statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$ /2 ( $r = 0,53$ ;  $p = 0,077$ ) i IFN- $\alpha$ /1 ( $r = 0,68$ ;  $p = 0,002$ ), a statistički značajno negativnu povezanost s IL-2/3 ( $r = -0,78$ ;  $p = 0,038$ ). Adenovirus IgM serumski protutijela pokazivala su statistički značajno negativnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-2/3 ( $r = -0,78$ ;  $p = 0,038$ ). Serumski parvovirus B19 IgM protutijela pokazivala su statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-4/3 ( $r = 0,996$ ;  $p < 0,001$ ), dok su parvovirus B19 IgG serumski protutijela pokazivala statistički značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-4/2 ( $r = 0,78$ ;  $p = 0,003$ ), a negativnu s IL-3/1 ( $r = -0,55$ ;  $p = 0,023$ ).

#### **4.7. Povezanost serumskih koncentracija citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ u djece i odraslih s težinom trombocitopenije, njenim trajanjem i terapijskim odgovorom**

##### **4.7.1. Povezanost serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, 10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ u djece i odraslih s brojem trombocita**

Broj trombocita u perifernoj krvi (n = 29) pri dijagnozi (slika 17) pokazivao je statistički značajnu negativnu povezanost jedino sa serumskim koncentracijama IL-3 pri dijagnozi (r = - 0,43; p = 0,021) (tablica 12). Nije bilo statistički značajne povezanosti broja trombocita u perifernoj krvi i serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$  (r = 0,01; p = 0,963), IL-2 (r = 0,09; p = 0,662), IL-4 (r = 0,06; p = 0,756), IL-6 (r = 0,21; p = 0,275), IL-10 (r = - 0,20; p = 0,297), TNF- $\alpha$  (r = - 0,10; p = 0,604), IFN- $\gamma$  (r = - 0,18; p = 0,359) i IFN- $\alpha$  (r = 0,13; p = 0,511) (tablica 12).



Slika 17. Prikaz negativne povezanosti broja trombocita u perifernoj krvi i serumskih koncentracija IL-3 u djece s AITP pri dijagnozi

U djece s AITP dokazana je statistički značajna negativna povezanost broja trombocita nakon 8 tjedana s IL-1 $\alpha$ /2 (r = - 0,38; p = 0,045) i broja trombocita nakon 6 mjeseci s IL-1 $\alpha$ /2 (r = - 0,41; p = 0,043), IL-2/2 (r = - 0,045; p = 0,025), IL-4/1 (r = - 0,042; p = 0,035), TNF- $\alpha$ /1 (r = - 0,41; p = 0,048), IFN- $\gamma$ /2 (r = - 0,41; p = 0,042) i s IFN- $\gamma$ /3 (r = - 0,66; p = 0,029), a statistički značajna pozitivna povezanost broja trombocita nakon 6 mjeseci s IL-3/1 (r = 0,42; p = 0,035).

U odraslih s AITP pri dijagnozi (n = 19) nije bilo statistički značajne povezanosti serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$  (r = 0,21; p = 0,391), IL-2 (r = 0,08; p = 0,730), IL-3 (r = - 0,23; p = 0,336), IL-4 (r = - 0,25; p = 0,310), IL-6 (r = 0,34; p = 0,151), IL-10 (r = 0,33; p = 0,166), TNF- $\alpha$  (r = - 0,33; p = 0,166), IFN- $\gamma$  (r = - 0,02; p = 0,927) i IFN- $\alpha$  (r = - 0,10; p = 0,692) i broja trombocita u perifernoj krvi (tablica 12).

Tablica 12. Prikaz povezanosti serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, 10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  s brojem trombocita u perifernoj krvi u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi

Citokini	Korelacija	Djeca	Odrasli
		Trombociti	Trombociti
IL-1 $\alpha$	r	0,01	0,21
	p	0,963	0,391
IL-2	r	0,09	0,08
	p	0,662	0,730
IL-3	r	<b>- 0,43</b>	- 0,23
	p	<b>0,021</b>	0,336
IL-4	r	0,06	- 0,25
	p	0,756	0,310
IL-6	r	0,21	0,34
	p	0,275	0,151
IL-10	r	- 0,20	0,33
	p	0,297	0,166
TNF- $\alpha$	r	- 0,10	- 0,33
	p	0,604	0,166
IFN- $\gamma$	r	- 0,18	- 0,02
	p	0,359	0,927
IFN- $\alpha$	r	0,13	- 0,10
	p	0,511	0,692

U odraslih s AITP broj trombocita pri dijagnozi i broj trombocita nakon 8 tjedana nije bio povezan sa serumskim koncentracijama odabranih citokina u sva tri mjerenja, dok je broj trombocita nakon 6 mjeseci bio statistički značajno pozitivno povezan s IL-4/2 (r = 0,81; p = 0,028) i IL-4/3 (r = 0,77; p = 0,045), a statistički značajno negativno povezan s IFN- $\gamma$ /3 (r = - 0,85; p = 0,015) i IL-3/3 (r = - 0,79; p = 0,034).

#### **4.7.2. Usporedba serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u djece i odraslih s AITP**

Rezultate usporedbe koncentracije citokina pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci (n = 11) u djece prikazuje tablica 13. U djece s AITP serumske koncentracije IL-1 $\alpha$  se nisu statistički značajno promijenile nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u odnosu na koncentracije pri dijagnozi ( $\chi^2 = 2,9$ ; p = 0,234). Promjene nisu dokazane ni kod IL-2 ( $\chi^2 = 3,8$ ; p = 0,150), IL-3 ( $\chi^2 = 0,88$ ; p = 0,643), IFN- $\gamma$  ( $\chi^2 = 1,64$ ; p = 0,441) i IFN- $\alpha$  ( $\chi^2 = 0,54$ ; p = 0,761), ali su dokazane kod IL-4, IL-6, IL-10 i TNF- $\alpha$ .

Promijenile su se statistički značajno serumske koncentracije IL-4 ( $\chi^2 = 9,14$ ; p = 0,010). Nije dokazana razlika u serumskim koncentracijama IL-4 pri dijagnozi i nakon 8 tjedana (z = 0,29; p = 0,78). Serumske koncentracije IL-4 bile su statistički značajno veće nakon 6 mjeseci od vrijednosti pri dijagnozi (z = 2,5; p = 0,013) i od vrijednosti nakon 8 tjedana (z = 2,5; p = 0,013).

Promijenile su se i serumske koncentracije IL-6 ( $\chi^2 = 11,09$ ; p = 0,004). Nije dokazana razlika u serumskim koncentracijama IL-6 nakon 8 tjedana prema koncentracijama pri dijagnozi (z = 0,63; p = 0,53). Serumske koncentracije IL-6 bile su statistički značajno veće nakon 6 mjeseci od koncentracija pri dijagnozi (z = 2,4; p = 0,016) i od koncentracija nakon 8 tjedana (z = 2,4; p = 0,016).

Promijenile su se i serumske koncentracije IL-10 ( $\chi^2 = 5,44$ ; p = 0,066). Nije dokazana razlika u koncentracijama IL-10 nakon 8 tjedana prema koncentracijama pri dijagnozi (z = - 0,41; p = 0,684) i nakon 6 mjeseci (z = - 1,33; p = 0,182). Serumske koncentracije IL-10 bile su statistički značajno niže nakon 6 mjeseci od koncentracija pri dijagnozi (z = - 1,79; p = 0,075). Promijenile su se i serumske koncentracije TNF- $\alpha$  ( $\chi^2 = 14,0$ ; p = 0,001). Nije dokazana razlika serumskih koncentracija TNF- $\alpha$  nakon 8 tjedana prema koncentracijama pri dijagnozi (z = 0,34; p = 0,73). Serumske koncentracije TNF- $\alpha$  bile su nakon 6 mjeseci statistički značajno niže nego pri dijagnozi (z = 2,9; p = 0,034) i nakon 8 tjedana (z = 2,8; p = 0,044).

Tablica 13. Prikaz serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  mjenjenih pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u djece s AITP

	Citokini	Mean $\pm$ SD pg/ml	Medijan pg/ml	Min-Maks pg/ml	$\chi^2$	p
IL-1 $\alpha$	Pri Dg	4,6 $\pm$ 2,58	4,0	0,4 - 8,0	2,91	0,234
	8 tjedan	3,7 $\pm$ 2,81	2,7	0,2 - 9,0		
	6 mjeseci	5,5 $\pm$ 2,99	5,5	0,8 - 10,0		
IL-2	Pri Dg	25,3 $\pm$ 7,75	22,0	18,0 - 43,5	3,80	0,150
	8 tjedan	26,9 $\pm$ 3,96	28,1	19,5 - 31,2		
	6 mjeseci	24,1 $\pm$ 2,23	24,0	20,0 - 27,4		
IL-3	Pri Dg	49,9 $\pm$ 12,99	46,9	21,0 - 65,1	0,88	0,643
	8 tjedan	56,2 $\pm$ 29,71	47,1	21,0 - 137,7		
	6 mjeseci	41,2 $\pm$ 22,31	29,9	18,0 - 72,0		
IL-4	Pri Dg	12,1 $\pm$ 8,74	8,2	7,9 - 31,0	9,14	<b>0,010</b>
	8 tjedan	12,5 $\pm$ 8,79	8,2	7,7 - 30,0		
	6 mjeseci	29,3 $\pm$ 14,86	29,0	14,4 - 61,5		
IL-6	Pri Dg	6,3 $\pm$ 6,29	4,2	3,1 - 25,0	11,09	<b>0,004</b>
	8 tjedan	7,8 $\pm$ 8,75	4,5	3,0 - 30,0		
	6 mjeseci	17,3 $\pm$ 16,83	9,9	7,3 - 63,0		
IL-10	Pri Dg	20,1 $\pm$ 4,54	18,6	15,4 - 29,8	5,44	<b>0,066</b>
	8 tjedan	20,3 $\pm$ 6,49	19,5	8,9 - 29,3		
	6 mjeseci	17,6 $\pm$ 5,32	16,7	13,0 - 33,0		
TNF- $\alpha$	Pri Dg	20,9 $\pm$ 3,78	19,9	16,1 - 29,7	14,00	<b>0,001</b>
	8 tjedan	21,0 $\pm$ 2,99	21,0	15,6 - 28,0		
	6 mjeseci	17,8 $\pm$ 1,14	18,0	16,0 - 19,5		
IFN- $\gamma$	Pri Dg	45,6 $\pm$ 4,89	45,0	36,2 - 57,0	1,64	0,440
	8 tjedan	50,4 $\pm$ 13,13	45,8	43,9 - 88,3		
	6 mjeseci	54,3 $\pm$ 17,52	47,7	36,2 - 98,8		
IFN- $\alpha$	Pri Dg	51,4 $\pm$ 24,79	44,0	17,5 - 89,0	0,55	0,761
	8 tjedan	44,9 $\pm$ 32,29	43,4	12,5 - 92,2		
	6 mjeseci	45,5 $\pm$ 25,02	43,0	13,0 - 105,0		

Rezultati usporedbe koncentracija citokina pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u odraslih s AITP (n = 6) prikazani su u tablici 14.

Tablica 14. Prikaz serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  mjerenih pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u odraslih s AITP

	Citokini	Mean $\pm$ SD pg/ml	Median pg/ml	Min-Maks pg/ml	$\chi^2$	p
IL-1 $\alpha$	Pri Dg	2,6 $\pm$ 2,02	2,5	0 - 5,7	0,61	0,738
	8 tjedan	2,0 $\pm$ 1,42	2,2	0,05 - 3,9		
	6 mjeseci	3,3 $\pm$ 1,12	3,3	2,0 - 5,2		
IL-2	Pri Dg	28,8 $\pm$ 1,35	27,5	27,4 - 27,4	1,83	0,401
	8 tjedan	27,9 $\pm$ 0,9	28,5	26,5 - 29,0		
	6 mjeseci	25,4 $\pm$ 4,6	26	16,9 - 30,2		
IL-3	Pri Dg	62,3 $\pm$ 4,71	60	56,9 - 70	2,33	0,311
	8 tjedan	57,4 $\pm$ 14,29	60	30,5 - 70		
	6 mjeseci	50,0 $\pm$ 15,83	61	30,9 - 69,7		
IL-4	Pri Dg	10,1 $\pm$ 2,38	9,4	8,1 - 14,4	2,33	0,311
	8 tjedan	26,8 $\pm$ 25,15	13,5	7,5 - 61,3		
	6 mjeseci	17,8 $\pm$ 18,75	10,8	7,6 - 55,9		
IL-6	Pri Dg	6,8 $\pm$ 2,56	7,5	3,4 - 9,6	3,0	0,223
	8 tjedan	8,0 $\pm$ 2,92	8,5	3,7 - 12,4		
	6 mjeseci	13,3 $\pm$ 8,78	9,1	7,3 - 30,4		
IL-10	Pri Dg	16,7 $\pm$ 0,61	17,0	15,5 - 17,1	1,33	0,513
	8 tjedan	14,8 $\pm$ 2,77	15,0	10,9 - 17,7		
	6 mjeseci	19,6 $\pm$ 6,58	17,2	16,3 - 33,0		
TNF- $\alpha$	Pri Dg	19,6 $\pm$ 2,46	19,6	16,6 - 22,7	3,55	0,170
	8 tjedan	21,3 $\pm$ 6,09	19,9	16,0 - 32,7		
	6 mjeseci	20,2 $\pm$ 6,32	18,0	15,6 - 32,0		
IFN- $\gamma$	Pri Dg	56,8 $\pm$ 14,24	55,6	43,0 - 81,3	4,33	0,115
	8 tjedan	55,7 $\pm$ 10,36	57,0	44,0 - 66,4		
	6 mjeseci	63,1 $\pm$ 5,83	63,3	54,0 - 72,0		
IFN- $\alpha$	Pri Dg	40,2 $\pm$ 26,7	35,8	8,8 - 87,9	0,26	0,878
	8 tjedan	40,3 $\pm$ 31,89	30,4	12,5 - 88,8		
	6 mjeseci	28,3 $\pm$ 13,23	24,1	16,3 - 45,3		

Serumske koncentracije se nisu statistički značajno promijenile nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u odnosu na koncentracije pri dijagnozi niti kod jednog od odabranih citokina: IL-1 $\alpha$  ( $\chi^2 = 0,61$ ;  $p = 0,738$ ), IL-2 ( $\chi^2 = 1,83$ ;  $p = 0,401$ ), IL-3 ( $\chi^2 = 2,33$ ;  $p = 0,311$ ), IL-4 ( $\chi^2 = 2,33$ ;  $p = 0,311$ ), IL-6 ( $\chi^2 = 3,00$ ;  $p = 0,223$ ), IL-10 ( $\chi^2 = 1,33$ ;  $p = 0,513$ ), TNF- $\alpha$  ( $\chi^2 = 3,54$ ;  $p = 0,170$ ), IFN- $\gamma$  ( $\chi^2 = 4,33$ ;  $p = 0,115$ ) i IFN- $\alpha$  ( $\chi^2 = 0,26$ ;  $p = 0,878$ ).



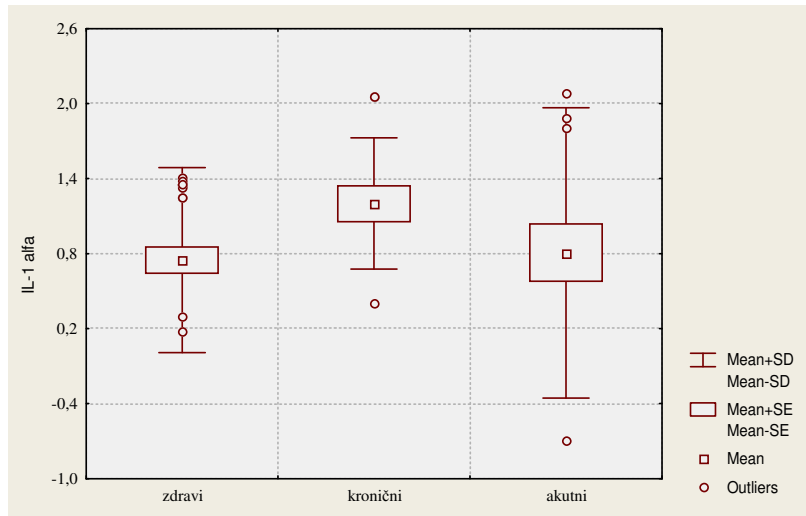
### **4.7.3. Razlike serumskih koncentracija citokina između ispitanika s akutnom AITP, kroničnom AITP pri dijagnozi i kontrolne skupine**

Nije bilo statistički značajne razlike u serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$  između zdravih ispitanika i onih s akutnom i kroničnom AITP ( $F = 1,48$ ;  $p = 0,234$ ) (slika 18).

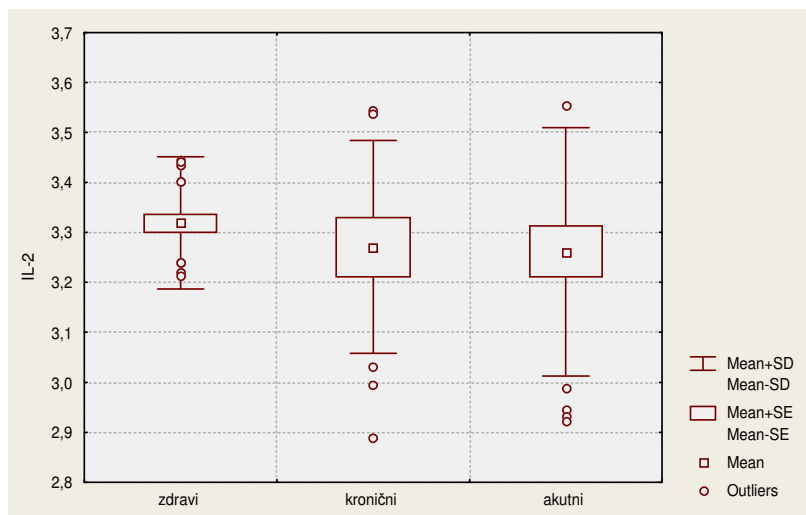
U zdravih ispitanika srednja vrijednost serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$  bila je  $2,6 \pm 1,27$  pg/ml (minimum 0,1 pg/ml; maksimum 5,80 pg/ml), u bolesnika s kroničnom AITP  $3,5 \pm 2,29$  pg/ml (minimum 0; maksimum 7,83 pg/ml), a u bolesnika s akutnom AITP  $2,8 \pm 2,42$  pg/ml (minimum 0; maksimum 8,0 pg/ml).

Nije bilo statistički značajne razlike u serumskim koncentracijama IL-2 između zdravih ispitanika i onih s akutnom i kroničnom AITP ( $F = 0,45$ ;  $p = 0,637$ ) (slika 19). U zdravih ispitanika srednja vrijednost serumskih koncentracija IL-2 bila je  $27,9 \pm 3,57$  pg/ml (minimum 17,0 pg/ml; maksimum 43,2 pg/ml), u bolesnika s kroničnom AITP  $26,9 \pm 5,46$  pg/ml (minimum 18,0 pg/ml; maksimum 34,60 pg/ml), a u bolesnika s akutnom AITP  $26,8 \pm 6,53$  pg/ml (minimum 17,50 pg/ml; maksimum 43,50 pg/ml).

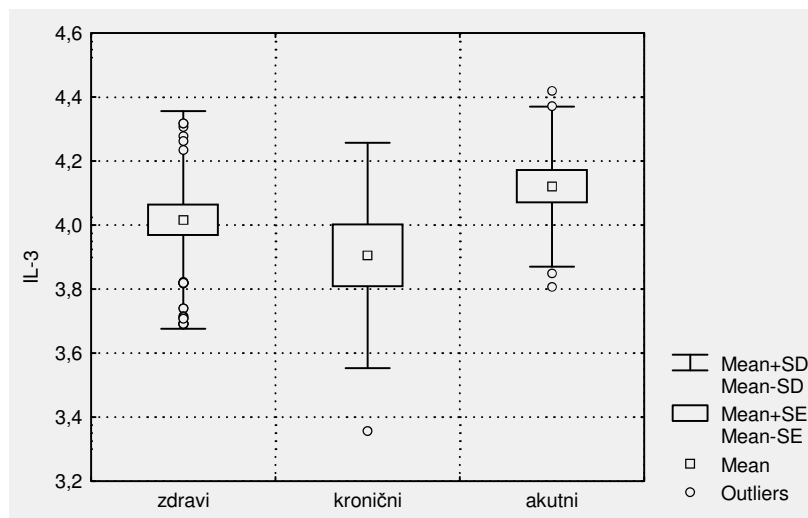
Nije bilo statistički značajne razlike u serumskim koncentracijama IL-3 između zdravih ispitanika i onih s akutnom i kroničnom AITP ( $F = 0,45$ ;  $p = 0,344$ ) (slika 20). U zdravih ispitanika srednja vrijednost serumskih koncentracija IL-3 bila je  $59,1 \pm 24,26$  pg/ml (minimum 31,2 pg/ml; maksimum 150,0 pg/ml), u bolesnika s kroničnom AITP  $52,2 \pm 14,79$  pg/ml (minimum 21,0 pg/ml; maksimum 70,0 pg/ml), a u bolesnika s akutnom AITP  $63,7 \pm 19,81$  pg/ml (minimum 40,0 pg/ml; maksimum 137,0 pg/ml).



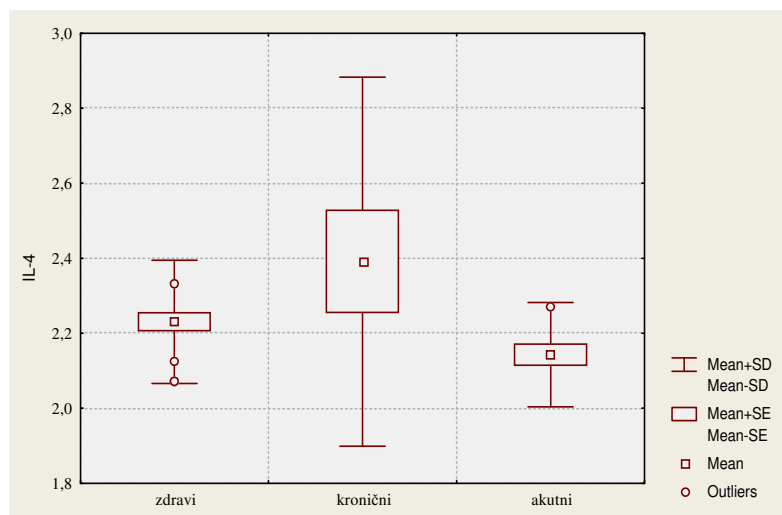
Slika 18. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-1 $\alpha$  u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi



Slika 19. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-2 u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi



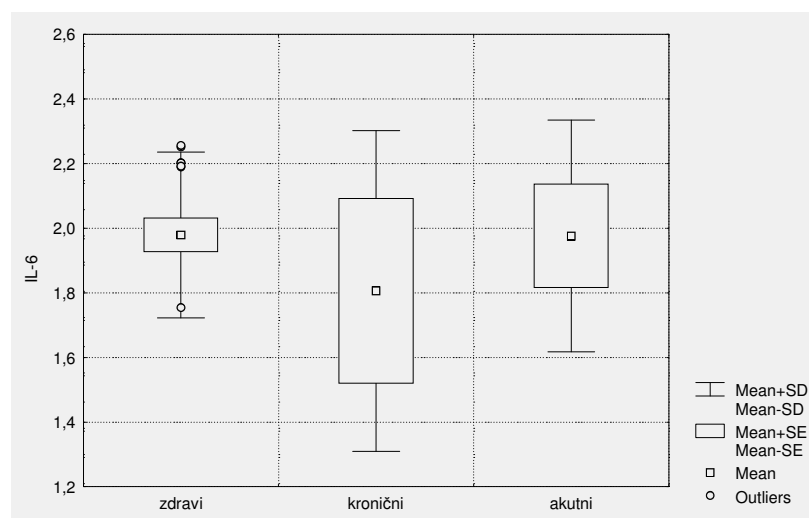
Slika 20. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-3 u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi



Slika 21. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-4 u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi

Između serumskih koncentracija IL-4 u zdravih ispitanika i onih s akutnom i kroničnom AITP dokazana je statistički značajna razlika ( $F = 5,29$ ;  $p = 0,007$ ) (slika 21). U zdravih ispitanika srednja vrijednost serumskih koncentracija IL-4 bila je  $9,4 \pm 1,76$  pg/ml (minimum 7,3 pg/ml; maksimum 14,9 pg/ml), u bolesnika s kroničnom AITP  $12,5 \pm 8,06$  pg/ml (minimum 7,8 pg/ml; maksimum 31,0 pg/ml), a u bolesnika s akutnom AITP  $8,6 \pm 1,47$  pg/ml (minimum 7,7 pg/ml; maksimum 14,4 pg/ml). **Bolesnici s kroničnom AITP su imali statistički značajno veće serumske koncentracije IL-4.**

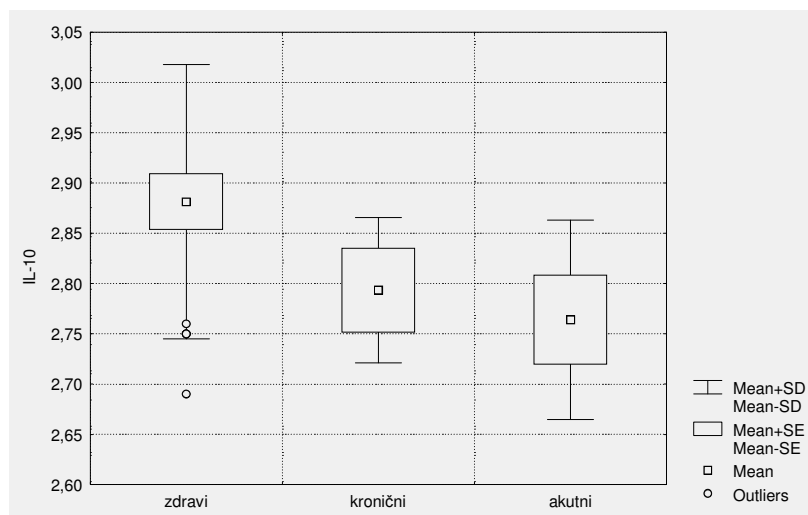
Između serumskih koncentracija IL-6 u zdravih ispitanika i onih s akutnom i kroničnom AITP nije dokazana statistički značajna razlike ( $F = 1,44$ ;  $p = 0,243$ ) (slika 22). U zdravih ispitanika srednja vrijednost serumskih koncentracija IL-6 bila je  $5,9 \pm 1,92$  pg/ml (minimum 3,2 pg/ml; maksimum 9,5 pg/ml), u bolesnika s kroničnom AITP  $6,8 \pm 5,8$  pg/ml (minimum 3,0 pg/ml; maksimum 25,0 pg/ml), a u bolesnika s akutnom AITP  $5,1 \pm 1,9$  pg/ml (minimum 3,0 pg/ml; maksimum 9,6 pg/ml).



Slika 22. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-6 u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi

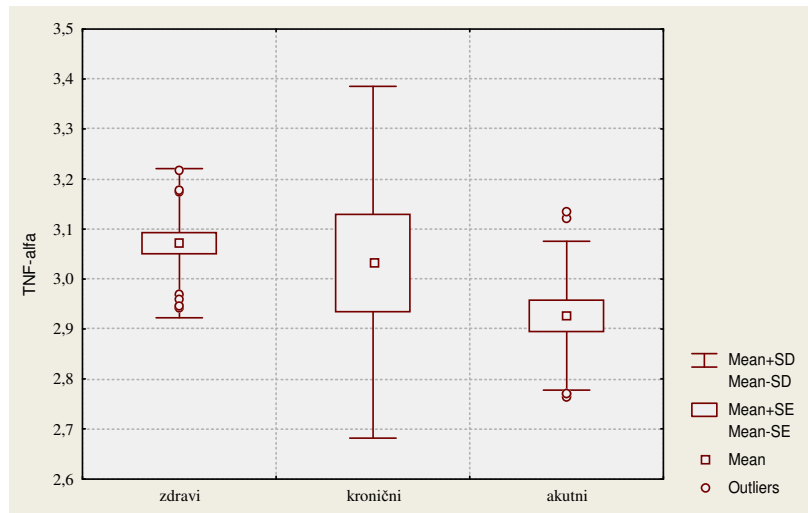
Između serumskih koncentracija IL-10 u zdravih ispitanika i onih s akutnom i kroničnom AITP nije dokazana statistički značajna razlika ( $F = 2,29$ ;  $p = 0,108$ ) (slika

23). U zdravih ispitanika srednja vrijednost serumskih koncentracija IL-10 bila je  $18,2 \pm 2,9$  pg/ml (minimum 14,7 pg/ml; maksimum 29,8 pg/ml), u bolesnika s kroničnom AITP  $20,2$  pg/ml  $\pm 6,8$  pg/ml (minimum 13,0 pg/ml; maksimum 34,9 pg/ml), a u bolesnika s akutnom AITP  $17,1 \pm 4,4$  pg/ml (minimum 10,5 pg/ml; maksimum 30,5 pg/ml).

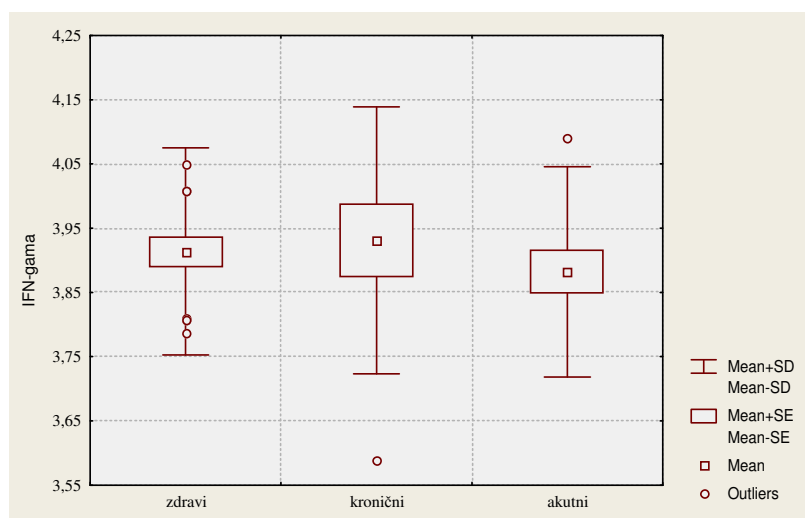


Slika 23. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-10 u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi

Između serumskih koncentracija TNF- $\alpha$  u zdravih ispitanika i onih s akutnom i kroničnom AITP dokazana je statistički značajna razlika ( $F = 4,36$ ;  $p = 0,016$ ). U zdravih ispitanika srednja vrijednost serumskih koncentracija TNF- $\alpha$  bila je  $21,8 \pm 3,47$  pg/ml (minimum 17,0 pg/ml; maksimum 33,0 pg/ml), u bolesnika s kroničnom AITP  $21,8 \pm 6,1$  pg/ml (minimum 7,9 pg/ml; maksimum 30,0 pg/ml), a u bolesnika s akutnom AITP  $18,9 \pm 3,03$  pg/ml (minimum 15,0 pg/ml; maksimum 28,0 pg/ml). **Bolesnici s akutnom AITP su imali statistički značajno manje serumske koncentracije TNF- $\alpha$**  (slika 24).



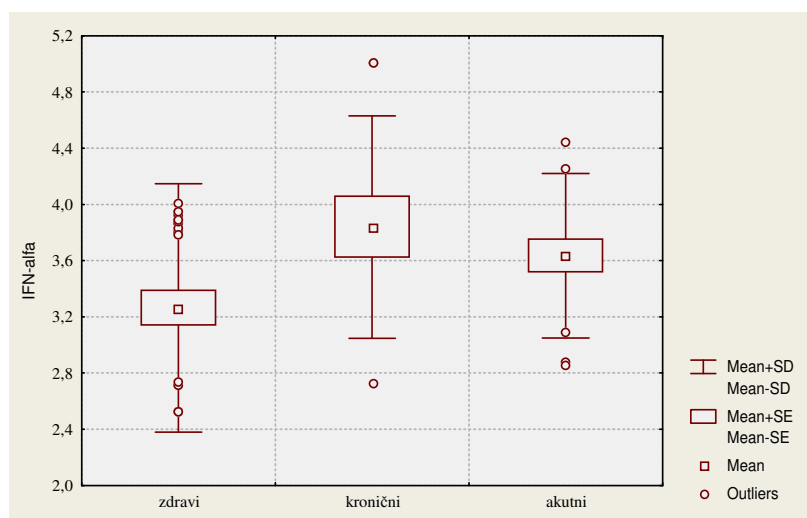
Slika 24. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD TNF- $\alpha$  u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi



Slika 25. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IFN- $\gamma$  u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi

Između serumskih koncentracija IFN- $\gamma$  u zdravih ispitanika i onih s akutnom i kroničnom AITP nije dokazana statistički značajna razlika ( $F = 0,39$ ;  $p = 0,674$ ) (slika 25). U zdravih ispitanika srednja vrijednost serumskih koncentracija IFN- $\gamma$  bila je  $50,7 \pm 8,3$  pg/ml (minimum 36,0 pg/ml; maksimum 68,3 pg/ml), u bolesnika s kroničnom AITP  $52,0 \pm 11,7$  pg/ml (minimum 36,2 pg/ml; maksimum 82,8 pg/ml), a u bolesnika s akutnom AITP  $49,2 \pm 9,4$  pg/ml (minimum 43,0 pg/ml; maksimum 81,3 pg/ml).

Između serumskih koncentracija IFN- $\alpha$  u zdravih ispitanika i onih s akutnom i kroničnom AITP dokazana je statistički značajna razlika ( $F = 3,74$ ;  $p = 0,028$ ) (slika 26). U zdravih ispitanika srednja vrijednost serumskih koncentracija IFN- $\alpha$  bila je  $36,1 \pm 25,37$  pg/ml (minimum 4,0 pg/ml; maksimum 89,0 pg/ml), u bolesnika s kroničnom AITP  $60,2 \pm 44,71$  pg/ml (minimum 8,8 pg/ml; maksimum 150,0 pg/ml), a u bolesnika s akutnom AITP  $44,1 \pm 23,71$  pg/ml (minimum 12,5 pg/ml; maksimum 88,0 pg/ml). **Bolesnici s kroničnom AITP su imali statistički značajno veće serumske koncentracije IFN- $\alpha$ .**



Slika 26. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IFN- $\alpha$  u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi

#### **4.8. Povezanost promjena i prognostičkih vrijednosti serumskih citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ u odnosu na prelazak bolesti u kronični oblik u djece i odraslih s akutnom AITP**

Upotrijebljena je višestruka regresija kako bi se dobio optimalni broj regresorskih varijabli (prediktora), koje utječu na regresand varijablu, trombocite mjerene nakon 6 mjeseci od dijagnoze u djece s AITP. Za regresorske varijable korištene su serumske koncentracije IL-3, IL-4, TNF- $\alpha$ , postotak cirkulirajućih limfocita T4 u krvi pri dijagnozi i broj trombocita mjeren nakon 8 tjedana u perifernoj krvi djece s AITP.

Koeficijent determinacije iznosio je 0,953, što znači da je protumačenost modela bila 95,3%. F-testom testirana je njegova značajnost, pa je koeficijent determinacije bio značajan na razini od 0,002.

Možemo zaključiti da bi se ovaj model mogao koristiti u svrhu prognoziranja vrijednosti trombocita mjerenih nakon 6 mjeseci od dijagnoze (Tr/3) u djece s AITP znajući vrijednost varijabli prediktora serumske koncentracije IL-3, IL-4, TNF- $\alpha$  i postotak cirkulirajućih limfocita T4 u krvi mjerenih pri dijagnozi kao i broj trombocita mjeren nakon 8 tjedana.

Pri tome možemo upotrijebiti jednadžbu višestruke regresije:  $\hat{y} = 107508 + 1462 \times X_1 - 7462 \times X_2 - 8361 \times X_3 + 3655 \times X_4 + 0,899 \times X_5$  gdje je  $\hat{y} = \text{Tr}/3$ ;  $X_1 = \text{IL-3}/1$ ;  $X_2 = \text{IL-4}/1$ ;  $X_3 = \text{TNF-}\alpha/1$ ;  $X_4 = \text{postotak limfocita T4 pri dijagnozi}$ ;  $X_5 = \text{Tr}/2$ .

Pearsonovim testom korelacije broj trombocita mjeren u perifernoj krvi nakon 6 mjeseci od dijagnoze statistički je značajno pozitivno korelirao sa serumskom koncentracijom IL-3/1 ( $r = 0,42$ ;  $p = 0,035$ ), postotkom cirkulirajućih limfocita T4 pri dijagnozi ( $r = 0,45$ ;  $p = 0,054$ ) i brojem trombocita u perifernoj krvi mjerenim nakon 8 tjedana ( $r = 0,51$ ;  $p = 0,005$ ), a statistički značajno negativno sa serumskom koncentracijom IL-4/1 ( $r = -0,42$ ;  $p = 0,035$ ) i TNF- $\alpha/1$  ( $r = -0,41$ ;  $p = 0,048$ ).

To znači da će u djece broj trombocita u perifernoj krvi 6 mjeseci od dijagnoze biti veći ako su serumske koncentracije IL-3, postotak cirkulirajućih limfocita T4 pri dijagnozi i broj trombocita mjerenih nakon 8 tjedana bili veći, a serumske koncentracije IL-4 i TNF- $\alpha$  pri dijagnozi bile manje.



Upotrijebljena je višestruka regresija kako bi se dobio optimalni broj regresorskih varijabli (prediktora) koje utječu na regresand varijablu, broj trombocita u perifernoj krvi mjerena nakon 8 tjedana od dijagnoze (Tr/2) u odraslih s AITP.

Za regresorske varijable korištene su vrijednosti apsolutnog broja limfocita, postotak cirkulirajućih limfocita B i NK stanica i serumske koncentracije IFN- $\alpha$  pri dijagnozi. Koeficijent determinacije iznosio je 0,933, što znači da je protumačenost modela bila 93,3%. F-testom testirana je njegova značajnost, pa je koeficijent determinacije bio značajan na razini od 0,046.

Ovaj bi se model mogao koristiti u svrhu prognoziranja vrijednosti trombocita mjerenih nakon 8 tjedana od dijagnoze u odraslih s AITP znajući vrijednost varijabli prediktora apsolutnog broja limfocita, postotka cirkulirajućih limfocita B i NK stanica i serumskih koncentracija IFN- $\alpha$  pri dijagnozi.

Pri tome možemo upotrijebiti jednadžbu višestruke regresije:  $\hat{y} = 43766 - 7194 \times X_1 - 6326 \times X_2 + 0,103 \times X_3 + 2793 \times X_4$  gdje je  $\hat{y} = \text{Tr}/2$ ;  $X_1 =$  postotak cirkulirajućih limfocita B pri dijagnozi;  $X_2 =$  postotak cirkulirajućih NK stanica pri dijagnozi;  $X_3 =$  apsolutni broj limfocita pri dijagnozi;  $X_4 =$  serumske koncentracije IFN- $\alpha/1$ .

Broj trombocita u perifernoj krvi mjerena nakon 8 tjedana od dijagnoze statistički je značajno pozitivno korelirao s apsolutnim brojem limfocita pri dijagnozi ( $p = 0,040$ ), a negativno s postotkom cirkulirajućih limfocita B pri dijagnozi ( $p = 0,028$ ). Negativna povezanost je postojala, ali nije bila statistički značajna s postotkom cirkulirajućih NK stanica ( $p = 0,112$ ) i pozitivna ali ne statistički značajna sa serumskim koncentracijama IFN- $\alpha/1$  ( $p = 0,268$ ).

To znači da će u odraslih broj trombocita u perifernoj krvi 8 tjedana od dijagnoze biti veći ako su apsolutni broj limfocita i serumske koncentracije IFN- $\alpha$  pri dijagnozi bili veći i ako je postotak cirkulirajućih limfocita B i NK stanica u krvi bili niži.

## 5. RASPRAVA

AITP je relativno rijetka bolest koja se klinički može podijeliti u dvije forme dječju AITP i onu u odraslih. Može trajati godinama pa i cijeli život. Neki su bolesnici praćeni i 30 godina. Incidencija kronične AITP u USA je 10 na 1.000.000 godišnje i češća je u odraslih (196). Javlja se u jednog djeteta od 25000 djece godišnje (197). Kronična AITP u djece javlja se u 0,46 na 100 000 djece godišnje (198). Ispitujući morbiditet i mortalitet u odraslih s AITP u grupi od 152 bolesnika u dobi od 15 godina i više Portielje je zaključila da je većina imala dobru prognozu uz rijetke hospitalizacije (199).

Dječja AITP se javlja u dva oblika: akutna bolest koja prestaje sama od sebe i kronična bolest s brojem trombocita u perifernoj krvi  $< 150 \times 10^9/L$  duže od 6 mjeseci (200). U oko 20% ispitanika s akutnom AITP bolest će preći u kroničan oblik, a specifični biljezi koji bi ukazivali na mogućnost razvoja kroničnog oblika bolesti, još nam nisu poznati. Bolton-Maggs tvrdi da čak 20-30% djece s AITP ne postiže remisiju nakon 6 mjeseci i to pretežno starija djeca-djevojčice, dok Karpatkin navodi da 7-28% djece razvije kroničnu AITP (201,202).

Rezultati analize prezentirane doktorske disertacije su pokazali da je nakon 6 mjeseci 65,5% djece i 62,5% odraslih postiglo remisiju bolesti. Djeca su pri dijagnozi imala značajno ( $p = 0,004$ ) niži prosječni broj trombocita u perifernoj krvi ( $17,4 \times 10^9/L$ ), za razliku od odraslih ( $36,8 \times 10^9/L$ ). Broj trombocita u perifernoj krvi pri dijagnozi  $< 10 \times 10^9/L$  imalo je 58% djece i 26% odraslih, a  $10-30 \times 10^9/L$  18% djece i 16% odraslih, a 18% djece i 21% odraslih  $30-50 \times 10^9/L$  i 6% djece i 37% odraslih  $50-80 \times 10^9/L$ . Broj trombocita u perifernoj krvi nakon 6 mjeseci značajno je porastao u djece s AITP ( $p < 0,001$ ) i u odraslih ( $p = 0,006$ ) u odnosu na vrijednosti pri dijagnozi. Broj trombocita pri dijagnozi nije se značajno razlikovao u svih bolesnika s akutnom i kroničnom AITP ( $p = 0,615$ ).

Različiti patogenetski mehanizmi mogu biti odgovorni za nastanak akutnog ili kroničnog oblika ove bolesti. Jedan od mogućih etioloških faktora je poremećaj citokinske ravnoteže, koji je zamijećen u tih bolesnika (3). Utjecaj poremećaja citokinske

ravnoteže na nastanak autoimunih bolesti, pa tako i AITP postaje sve više predmetom interesa, ali se danas još uvijek malo zna o ulozi citokina u autoimunoj patogenezi ove bolesti. Većina analiza se bazira na usporedbi pojedinih imunoloških parametara djece i odraslih s ciljem da se otkrije zbog čega je ova bolest različitog tijeka i prognoze u ove dvije skupine bolesnika.

Hipoteza od koje polazi ovo istraživanje je da u AITP poremećaj citokinske ravnoteže igra važnu ulogu u patogenetskom mehanizmu nastanka bolesti, koji se vjerojatno razlikuje u djece i odraslih ljudi. Analizom serumskih koncentracija citokina to je i dokazano. Djeca s AITP pri dijagnozi su imala značajno veće serumske koncentracije IL-4 ( $p = 0,062$ ) i značajno niže koncentracije IL-2 ( $p = 0,021$ ) i TNF- $\alpha$  ( $p = 0,009$ ) od zdrave djece. Između zdrave djece i one s AITP nije bilo značajne razlike u serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$  ( $p = 0,146$ ), IL-3 ( $p = 0,445$ ), IL-6 ( $p = 0,233$ ), IL-10 ( $p = 0,554$ ), IFN- $\gamma$  ( $p = 0,830$ ) i IFN- $\alpha$  ( $p = 0,252$ ).

Odrasli s AITP pri dijagnozi su imali značajno veće serumske koncentracije IL-1 $\alpha$  ( $p = 0,045$ ) i IL-4 ( $p = 0,011$ ), a značajno manje koncentracije IL-10 ( $p = 0,041$ ) od zdravih ispitanika, za razliku od serumskih koncentracija IL-2 ( $p = 0,660$ ), IL-3 ( $p = 0,230$ ), IL-6 ( $p = 0,503$ ), TNF- $\alpha$  ( $p = 0,494$ ), IFN- $\gamma$  ( $p = 0,336$ ) i IFN- $\alpha$  ( $p = 0,537$ ) koje se nisu značajno razlikovale.

Također je dokazana razlika u serumskim koncentracijama pojedinih citokina u djece i odraslih. Djeca s AITP su pri dijagnozi imala značajno niže serumske koncentracije IL-4 ( $p = 0,033$ ), IL-6 ( $p = 0,004$ ) i IFN- $\gamma$  ( $p = 0,001$ ), a značajno više serumske koncentracije IFN- $\alpha$  ( $p = 0,007$ ) od odraslih s AITP, za razliku od serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$  ( $p = 0,432$ ), IL-2 ( $p = 0,838$ ), IL-3 ( $p = 0,468$ ), IL-10 ( $p = 0,333$ ) i TNF- $\alpha$  ( $p = 0,987$ ), koje nisu pokazivale značajnu razliku.

Iz rezultata je vidljiva značajna negativna povezanost broja trombocita u djece mjerenih nakon 8 tjedana od dijagoze sa serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$ /2, a mjerenih nakon 6 mjeseci sa serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$ /2, IL-2/2, IL-4/1, TNF- $\alpha$ /1, IFN- $\gamma$ /2 i s IFN- $\gamma$ /3. U odraslih s AITP broj trombocita u perifernoj krvi pri dijagnozi i nakon 8 tjedana nije pokazivao značajnu povezanost ni s jednim od odabranih citokina u sva tri mjerenja, dok je broj trombocita nakon 6 mjeseci pokazivao značajnu pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-4, a značajnu negativnu s IFN- $\gamma$  i IL-3.

U mnogim je studijama ispitivana uloga IL-2 kod autoimunih bolesti. Najnovije studije ukazuju da je funkcija IL-2 u apoptozi limfocita iznimno važna (203). Shenoy sa suradnicima je pokazao da u 25% bolesnika s imunom citopenijom postoji defekt u induciranoj staničnoj smrti limfocita zbog Fas mutacije uslijed čega je blokirana eliminacija limfocita (204). IL-2 igra središnju ulogu u humanom imunom odgovoru i povećane vrijednosti ovog citokina su pronađene kod različitih autoimunih bolesti kao što su multipla skleroza, RA i SLE (205-207).

Hipersekrecija endogenog IL-2 može voditi u autoagresiju na više načina, primjerice inducirajući ostale citokine, kao IFN- $\gamma$  i IL-10 (64). Abdel-Raheem i suradnici opisuju nastanak Evansova sindroma u bolesnika koji je liječen sa IL-2 (65). Erduran je mjerio solubilni IL-2 receptor (sIL-2R) u bolesnika s AITP i zdravih ispitanika i pronašao je da postoji negativna povezanost između broja trombocita i nivoa sIL-2R, što su mjereni nivoi sIL-2R bili veći broj trombocita je bio manji (208).

Povećane vrijednosti citokina, zajedno s in vitro trombocitima stimuliranim stvaranjem IL-2, mogu biti važan test u otkrivanju razlike u patofiziologiji akutne i kronične forme AITP i mogu pomoći da se otkrije koja djeca će iz akutne forme razviti kroničnu formu bolesti. Semple sa suradnicima je istraživao hipotezu da abnormalnosti membrane trombocita i abnormalne koncentracije citokina mogu biti značajne u patogenezi AITP (5). Semple navodi da 53% djece s kroničnom AITP i samo 9 % onih s akutnom AITP imaju povećane vrijednosti IL-2 u serumu (5).

U prezentiranoj doktorskoj disertaciji nije dokazana značajna razlika u serumskim koncentracijama IL-2 između ispitanika s akutnom, kroničnom AITP pri dijagnozi i kontrolne skupine. Ipak su serumske koncentracije IL-2 u djece bile niže od kontrolne skupine.

IL-3 sam i u kombinaciji s ostalim čimbenicima koji stimuliraju kolonije, koristan je u rekonstrukciji KS, povećava broj neutrofila i trombocita i podržava ranu megakariocitopoezu (209). Veoma je važan u liječenju trombopenija, tako da primjena IL-3 nakon davanja IL-6 bitno popravlja broj trombocita u perifernoj krvi.

IL-3 ima značajni učinak na megakariocitopoezu djelujući na megakariocite, pa bi trebalo ispitati da li postoji mehanizam povratne sprege između broja trombocita i serumskih koncentracija IL-3. Bilo bi važno procijeniti ulogu IL-3 u patogenezi

imunotrombocitopenije posebno zbog toga što se zna da sudjeluje u regulaciji i kontroli mijelopoetskog sustava.

Brojni autori naglašavaju ulogu IL-3 u megakariocitopoezi i djelovanje ovog citokina na pojačano stvaranja megakariocita i trombocita. Yang je, pišući o ulozi citokina na regulaciju megakariocitopoeze i nastanku trombocita, naglasio da u megakariocitopoezi osim trombopoetina sudjeluju i IL-1, IL-3 i IL-6 (210). Bruno je pokazao da kombinacija IL-3+SCF+IL-6+TPO inducira značajno stvaranje megakariocita iz CD34+ stanica (211).

Ispitujući da li postoji povezanost broja trombocita u perifernoj krvi i serumskih koncentracija IL-3 u djece s AITP u prezentiranoj disertaciji dokazano je, da je broj trombocita u perifernoj krvi pri dijagnozi i nakon 6 mjeseci bio značajno povezan sa serumskim koncentracijama IL-3 pri dijagnozi i to Tr/1 s IL-3/1 ( $p = 0,021$ ) negativno, a Tr/3 s IL-3/1 ( $p = 0,035$ ) pozitivno. Što su trombociti pri dijagnozi bili veći serumske koncentracije IL-3 su bile manje, za razliku od broja trombocita nakon 6 mjeseci, koji su bili veći što je IL-3 pri dijagnozi bio veći. Nije bilo značajne razlike u serumskim koncentracijama IL-3 između ispitanika s akutnom, kroničnom AITP i kontrolne skupine.

U odraslih s AITP nije uočena značajna povezanost broja trombocita sa serumskim koncentracijama IL-3 u sva tri mjerenja. Serumske koncentracije IL-3 u djece i odraslih nisu se značajno razlikovale u sva tri mjerenja. Svakako bi daljnja ispitivanja vezana uz IL-3 kod AITP mogla pomoći u razumijevanju biologije ove bolesti, jer je IL-3 važan čimbenik u megakariocitopoezi.

Webber je dokazao u djece i odraslih s AITP, da serumske koncentracije Th2 citokina IL-4 su značajno veće u bolesnika s AITP nego u zdravih individua. Isti autor predlaže liječenje AITP djelovanjem na solubilni IL-4. Nije bilo povezanosti između vrijednosti bolesnikovih trombocita i serumskih koncentracija IL-4, iako su koncentracije IL-4 u serumu bile povećane (212). Ovaj citokin, esencijalan za T zavisne limfocite B, može igrati značajnu ulogu u stvaranju autoprotutijela.

Serumske koncentracije IL-4 u ispitivane djece i odraslih s AITP, u prezentiranoj disertaciji, su također bile značajno veće nego u kontrolnoj skupini. Dokazano je da su i ispitanici s kroničnom AITP pri dijagnozi imali značajno veće serumske koncentracije IL-4 od ispitanika s akutnom AITP i kontrolne skupine. U djece je dokazano da su

serumske koncentracije IL-4 mjerene 6 mjeseci od dijagnoze bile značajno veće od onih pri dijagnozi i nakon 8 tjedana, što do sada nije opisano u literaturi. U odraslih te razlike nije bilo.

U djece s AITP nije dokazana značajna povezanost broja trombocita u perifernoj krvi s istovremeno ispitivanim serumskim koncentracijama IL-4, ali je evidentna značajna negativna povezanost serumskih koncentracija IL-4 pri dijagnozi s brojem trombocita nakon 6 mjeseci ( $p = 0,035$ ) kada se može dijagnosticirati kronična AITP. Ovo saznanje korišteno je u odabiru prediktora, pa su serumske koncentracije IL-4 pri dijagnozi upotrijebljene kao jedan od prediktora u modelu za prognozu AITP u djece. Istovremeno serumske koncentracije IL-4 pri dijagnozi pokazale su značajnu pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-4 ( $p < 0,001$ ) mjerenim nakon 8 tjedana.

U odraslih s AITP serumske koncentracije IL-4 nisu pokazivale značajnu povezanost s brojem trombocita istovremeno ispitivanim pri dijagnozi, ali je broj trombocita nakon 6 mjeseci, kada se može dijagnosticirati kronična AITP, pokazivao značajnu pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-4 u sva tri mjerenja.

Ovo saznanje da bolesnici s AITP imaju povećane koncentracije IL-4 je značajno jer ovaj interleukin može utjecati na nastanak patogenih protutijela i značajan je za diferencijaciju limfocita B ovisnih o limfocitima T. Osim toga može potiskivati humanu megakariocitopoezu (102). Relativno visoke koncentracije IL-4 u plazmi bolesnika s AITP ukazuju da ovi bolesnici generiraju Th2 tip stanica, što može biti i primarni nedostatak u ovih bolesnika ili možda ukazuju na prisustvo stimulusa koji potiče nastanak Th2. Izgleda da ovi bolesnici razviju Th0 citokinski profil, koji se može okrenuti u Th1 aktivaciju. Drugi profil citokina, koji nisu u Th1/Th2, može biti prisutan, npr. TGF- $\beta$  snažni Th3 imunosupresivni citokin (213,214). Inobe je ispitivao utjecaj IL-4 u generaciji limfocita Th3 i dokazao da IL-4, ali ne i IL-2 i IFN- $\gamma$  djeluju na nastanak limfocita Th3 iz nezrelih limfocita T, a ove stanice pomažu stvaranje IgA (215).

Obzirom da su neki od serumskih citokina u bolesnika s AITP povišeni, a neki sniženi, manipulacija citokinima bi mogla biti jedan od načina liječenja AITP. Ona se već danas svakako koristi primjenom kortikosteroida i IVIG-a u autoimunim bolestima (216). AITP u djece obično nestaje nakon prve episode. Akutna AITP se obično prezentira s Th1, Th0/Th1, ili Th0 profilom. Mouzaki smatra da je stabilna remisija udružena s Th0

ili Th2 profilom, a Th0 ili Th2 profil nakon terapije IVIG-om je bolje prognoze dok visoka ekspresija IFN- $\gamma$  i refrakternost na IVIG znači lošu prognozu bolesti (217).

IL-4 serumski citokin može biti potencijalni cilj u liječenju ove bolesti. Crossley je dokazao da IFN- $\alpha$  ako se koristi u liječenju AITP povećava Th1 aktivnost i smanjuje stvaranje protutijela smanjujući visoke serumske koncentracije IL-4 i/ili IL-10 (218). Anderson i suradnici su proučavali serumske koncentracije Th citokina i limfocite T i B u kroničnoj AITP i uočili su da je Th2 citokin IL-4 bio vrlo nizak u oboljelih i u kontrolnoj skupini (214). Paleolog je pokazao da IL-4 pojačava stvaranje IL-6 (219).

U prezentiranom istraživanju nije dokazana značajna razlika u serumskim koncentracijama IL-6 između zdrave djece i djece s AITP ( $p = 0,233$ ), zdravih i odraslih s AITP ( $p = 0,503$ ), ali su u odraslih s AITP serumske koncentracije IL-6 bile značajno veće nego u djece s AITP ( $p = 0,004$ ). U djece s AITP serumske koncentracije IL-6 su bile značajno veće nakon 6 mjeseci od koncentracija pri dijagnozi i nakon 8 mjeseci ( $p = 0,016$ ), za razliku od odraslih u kojih te razlike nije bilo ( $p = 0,223$ ). Serumske koncentracije IL-6 nisu se razlikovale između bolesnika s akutnom i kroničnom AITP pri dijagnozi. Niti Olcay u svom ispitivanju nije našao značajnu razliku u serumskim koncentracijama u bolesnika s akutnom i kroničnom AITP, ali je dokazao da je došlo do značajnog pada serumskih koncentracija IL-6 nakon liječenja metilprednisolonom (220). IL-6 djeluje na megakariocitopoezu i možda veće serumske koncentracije pomažu oporavku djece s akutnom AITP.

Williams smatra da IL-6 direktno djeluje na progenitore megakariocita, ali jedino zajedničkim djelovanjem s IL-3 pomaže u sazrijevanju megakariocita (221). IL-6 potiče rast megakariocitnih progenitora u prisutnosti IL-3, IL-4 i EPO, regulirajući rast progenitornih stanica u različitom stadiju sazrijevanja što je pokazao Rennick na eksperimentalnom mišjem modelu (222).

IL-6 stimulira megakariocitopoezu u KS povećavajući broj trombocita u cirkulaciji. Brojni autori naglašavaju ulogu IL-6 u megakariocitopoezi i djelovanje ovog citokina na pojačano stvaranja megakariocita i trombocita (223,224). Rana proliferacija i razvoj megakariocita potaknuti su trombotetinom i brojnim drugim citokinima među

kojima je i IL-6. Tek zajedničkim djelovanjem može se potaknuti maksimalna megakariocitopeza (225).

IL-10 je imunoregulatorni citokin, koji može modulirati imune procese inhibirajući upalni Th1 odgovor. U eksperimentalnom mišjem modelu limfociti pod utjecajem IL-10 luče manje IFN- $\gamma$  i IL-2 (226).

Panitsas i suradnici su u odraslih s AITP ukazali na jasnu polarizaciju Th1 imunog odgovora, a u bolesnika s aktivnom bolešću na snižene serumske koncentracije TGF $\beta$ 1 (227). IL-10 ima značajni imunostimulatorni učinak na limfocite B i supresivan učinak na monocite i makrofage što dovodi do smanjenja upalnih citokina kao što je IL-6 (228). Povećane koncentracije IL-10 nađene su u nekih bolesnika s AITP. Andersson sa suradnicima je dokazao značajno niže koncentracija IL-10 u bolesnika s kroničnom AITP i trombocitima manjim od  $50 \times 10^9/L$  nego u zdravih osoba ili bolesnika čije su vrijednosti trombocita bile od 50-150  $\times 10^9/L$  (214).

U ispitivanoj skupini nije bilo značajne razlike u serumskim koncentracijama IL-10 u djece s AITP pri dijagnozi i zdrave djece. U odraslih serumske koncentracije su bile značajno veće u zdravih ispitanika ( $p = 0,041$ ). Između djece i odraslih s AITP nije bilo značajne razlike u serumskim koncentracijama IL-10 ( $p = 0,338$ ). Neki autori naglašavaju da IVIG može popraviti neravnotežu IL-10 u AITP. Nakon administracije IVIG-a rastu serumske koncentracije IL-10 koje koreliraju s porastom trombocita (229).

U djece s AITP možemo pratiti dinamiku promjena serumskih koncentracija IL-10 kroz 8 tjedana i 6 mjeseci. Serumske koncentracije IL-10 bile su značajno niže nakon 6 mjeseci od koncentracija pri dijagnozi ( $p = 0,075$ ), što do sada u literaturi nije objavljeno. U odraslih nije bilo razlike u mjerenjima. Također nije bilo značajne razlike u mjerenjima između ispitanika s akutnom, kroničnom AITP i kontrolne skupine. Koji čimbenik je odgovoran za značajnu dinamiku IL-10 u djece s AITP, a koji da te dinamike u odraslih nema?

IFN- $\alpha$  povećava broj trombocita u bolesnika s AITP. U bolesnika koji su imali povećane koncentracije IL-4 i IL-10 nakon liječenja IFN- $\alpha$  došlo je do smanjenja istih. NK stanična aktivnost, koja je bila niža prije liječenja povećava se, pojačava se i Th1



aktivnost i smanjuje stvaranje protutijela (230). Analizirajući serumske citokine u bolesnika s AITP Lazarus je pokazao da nisu imali povišene koncentracije IL-10 (231).

U djece s AITP serumske koncentracije TNF- $\alpha$  su bile nakon 6 mjeseci značajno niže nego pri dijagnozi ( $p = 0,034$ ) i nakon 8 tjedana ( $p = 0,044$ ). Djeca s AITP su imala i značajno niže serumske koncentracije TNF- $\alpha$  pri dijagnozi od kontrolne skupine. U odraslih nije bilo razlike u mjerenjima. Iz rezultata je vidljivo da nije bilo značajne razlike u serumskim koncentracijama TNF- $\alpha$  između djece i odraslih pri dijagnozi. Serumske koncentracije TNF- $\alpha$  značajno su se razlikovale između ispitanika s akutnom, kroničnom AITP pri dijagnozi i kontrolne skupine. Ispitanici s akutnom AITP su imali značajno manje koncentracije ( $p = 0,016$ ). U radu Lazarusa i suradnika nisu dokazane povećane serumske koncentracije TNF- $\alpha$  (231)

Autoimuna bolest može nastati dijelom zbog abnormalnog ispoljavanja HLA-DR molekula na površini ciljnih stanica, što može aktivirati limfocite T i sintezu autoprotutijela. Prolazno ispoljavanje HLA-DR može biti uzrokovano citokinima kao što je IFN- $\gamma$ . Gajewski je pokazao da IFN- $\gamma$  može inhibirati proliferaciju stanica KS stimuliranim s IL-3, IL-4 ili GM-CSF u mišjem modelu i na taj način dokazao antiproliferativni učinak IFN- $\gamma$  u imunoj regulaciji (232).

Da abnormalno stvaranje TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  može utjecati na patogenezu AITP zaključio je i Garcia-Suarez sa suradnicima primjetivši da su serumske koncentracije oba citokina značajno povišene u bolesnika koji su ovisni o liječenju za razliku od zdravih ispitanika. Ovi citokini djeluju na limfocite B da se diferenciraju u stanice koje luče imunoglobuline. Težina kliničke slike je povezana s poremećenom sekrecijom ova dva citokina (233).

Serumske koncentracije IFN- $\gamma$  nisu se značajno razlikovale između djece i odraslih s AITP i kontrolne skupine, ali je dokazana značajna razlika između djece i odraslih s AITP. Odrasli s AITP su imali značajno veće serumske koncentracije IFN- $\gamma$  od djece s AITP ( $p = 0,001$ ). Serumske koncentracije IFN- $\gamma$  nisu se značajno razlikovale u ispitanika s akutnom, kroničnom AITP pri dijagnozi i kontrolne skupine. Nije bilo

značajnih razlika u serumskoj koncentraciji IFN- $\gamma$  mjenjenih pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci ni u djece niti u odraslih.

U djece akutna AITP se prezentira s Th1, Th0/Th1 ili Th0 ekspresijom citokina. U stabilnoj remisiji izraženi su Th0 ili Th2 citokini uz kojih je, nakon liječenja IVIG-om, vezana bolja prognoza bolesti, dok visoke koncentracije IFN- $\gamma$  i neosjetljivost na liječenje IVIG-om govori u prilog lošijoj prognozi bolesti. Semple navodi da 53% djece sa kroničnom AITP i samo 9 % onih sa akutnom AITP imaju povećane vrijednosti IFN- $\gamma$  u serumu (5).

Serumske koncentracije IFN- $\alpha$  nisu se značajno razlikovale između djece i odraslih s AITP i kontrolne skupine. Dokazano je da su u odraslih s AITP serumske koncentracije IFN- $\alpha$  bile značajno niže nego u djece ( $p = 0,007$ ). Nisu dokazane promjene u serumskim koncentracijama nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u odnosu na koncentracije pri dijagnozi ni u djece niti u odraslih s AITP.

Iz rezultata je vidljivo da serumske koncentracije IL-4, IL-6 i TNF- $\alpha$  6 mjeseci od zaprimanja su bile značajno veće u djece s AITP, za razliku od odraslih s AITP u kojih nije bilo značajne razlike serumskih koncentracija svih citokina pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci. Do sada nije opisana u literaturi prezentirana dinamika serumskih koncentracija IL-4, IL-6 i TNF- $\alpha$  u vremenu do 6 mjeseci od dijagnoze u djece s AITP.

Između zdravih ispitanika i onih s akutnom i kroničnom AITP nije bilo značajne razlike u serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-6, IL-10 i IFN- $\gamma$  pri dijagnozi. Značajno veće su bile serumske koncentracije IL-4 u bolesnika s kroničnom AITP nego u zdravih ispitanika i onih s akutnom AITP. Bolesnici s akutnom AITP su imali značajno manje serumske koncentracije TNF- $\alpha$  od zdravih ispitanika i onih s kroničnom AITP, dok su bolesnici s kroničnom AITP imali značajno veće serumske koncentracije IFN- $\alpha$  od zdravih ispitanika i onih s akutnom AITP.

Distribuciju subpopulacija limfocita u bolesnika s AITP ispitalo je više istraživača, neki su otkrili značajno sniženje postotka i apsolutnog broja cirkulirajućih limfocita T8 (234). Značajno snižen postotak, funkciju sveukupnih limfocita T, postotak

cirkulirajućih limfocita T4 i povećan postotak cirkulirajućih limfocita T8, ali ne i promjene u postotku i funkciji limfocita B dokazao je Mylvaganam (235).

Garcia-Suarez i suradnici su objavili izvještaj o tri bolesnika s AITP koji su nakon splenektomije razvili apsolutnu limfocitozu s ekspanzijom NK stanica. Dvoje od ova tri bolesnika su bili refrakterni na splenektomiju (236).

U prezentiranom ispitivanju postotak cirkulirajućih limfocita B iznad granice normale imalo je 22% djece dok je u 78% bio u granicama normale. U odraslih 13,3% je imalo postotak cirkulirajućih limfocita B ispod granica normale, a 86,7% u granicama normale.

Najnovije studije ukazuju da je AITP vezana uz promjene u imunom sustavu koje nisu samo ograničene na limfocite B nego također zahvaćaju populaciju limfocita T. Značajan porast CD56+CD3+ citotoksičnih limfocita T i CD56+CD3+ NK stanica je uočio Garcia-Suarez sa suradnicima u bolesnika koji su bili refrakterni na standardno liječenje (237).

Kronična AITP je u odraslih bolesnika karakterizirana stvaranjem autoprotutijela što je regulirano limfocitima T4. Više studija ukazuje da u bolesnika s AITP postoji abnormalna limfocitna aktivacija i abnormalno Th1/Th2 stvaranje citokina. Lazarus smatra da se radi o poremećaju prenosa transmembranskog signala u limfocitima (238). Posljednjih desetljeća brojne studije opisuju defekt limfocita T i pokušavaju osvijetliti njihovu ulogu u patogenezi AITP. Neki autori su ispitivali receptore limfocita T, ali još uvijek je nedovoljno studija koje bi potvrdile patofiziološki mehanizam promjena. Potrebno je još ispitivanja (239).

U ispitivanoj skupini djece s AITP postotak cirkulirajućih limfocita T4 je u značajnom postotku (52,6%) bio ispod granica normale pri dijagnozi, za razliku od odraslih u kojih je taj postotak u odnosu na djecu bio nešto niži (27,6%).

Evidentno je da stvaranje protutijela pomoću limfocita B zahtijeva pomoć limfocita T. Autoreaktivne stanice su limfociti T4 poznati kao pomoćničke stanice koje selektivno pomažu limfocitima B u stvaranju protutijela (240). Kuwana sa suradnicima je identificirao autoreaktivne limfocite T, koji pomažu limfocitima B u stvaranju protutijela na trombocitni membranski GPIIb-IIIa, koji je najvažniji cilj antitrombocitnih protutijela. Autori naglašavaju da su potrebna daljnja istraživanja autoreaktivnih limfocita T, koja će

možda rasvijetliti patogenezu kronične AITP i pomoći u odabiru liječenja refrakternih bolesnika (241,242).

Još uvijek nema studija koje bi objasnile imunoregulaciju nastanka antitrombocitnih protutijela (243). Garcia-Suarez sa suradnicima je pronašao u bolesnika s AITP povećan postotak in vivo aktiviranih (CD25+/DR+) limfocita T, čiji je proliferativni odgovor na poliklonalne mitogene signale oštećen. On smatra da je funkcionalno oštećenje udruženo sa redistribucijom limfocita T u perifernoj krvi, gdje je evidentan nedostatak limfocita T4. Također je pronašao da je oštećenje funkcije limfocita T različito u različitim periodima bolesti. U bolesnika sa stabilnom neliječenom bolešću značajno je smanjen proliferativni odgovor limfocita T na mitogene, dok oni bolesnici koji ne odgovaraju na steroide i splenektomiju pokazuju značajno smanjenu blastogenezu nakon stimulacije limfocita T fitohemaglutininom (244).

Evidentno je da je nastanak antitrombocitnih protutijela pod utjecajem različitih abnormalnih mehanizama vezanih uz limfocite, povećanu aktivnost limfocita T4, a smanjenu aktivnost limfocita T8, o čemu je pisao Semple sa suradnicima (245). Analizirao je fenotip limfocita u perifernoj krvi u bolesnika s AITP i ukazao na znatno smanjenje CD4+/Leu8+T supresorskih/inducirajućih stanica i istovremeno povećanje CD3+/DR+ aktiviranih limfocita T i CD19+ limfocita B. Isti autor smatra da su limfociti T4 u bolesnika s AITP stimulirani da luče IL-2 i mogu modulirati pojačani antitrombocitni odgovor (246). Patološki stanični imunološki odgovor u AITP je vezan uz defekt u populaciji limfocita T, dok populacija limfocita B nije zahvaćena. U kroničnoj AITP abnormalnost staničnog imuniteta je dokazao i Mylvaganam sa suradnicima kada je pokazao da su bolesnici s AITP u aktivnoj fazi imali značajno smanjen postotak limfocita T4 i povećan postotak limfocita T8, ali nije dokazao odstupanja u funkciji i postotku limfocita B (247).

Iz rezultata je vidljivo da nije bilo značajne razlike u apsolutnom broju limfocita u perifernoj krvi, postotku cirkulirajućih limfocita T, B, T8 i NK stanica između djece i odraslih s AITP. Postotak cirkulirajućih limfocita T4 u djece s AITP je bio značajno manji nego u odraslih.

Broj trombocita u perifernoj krvi u sva tri mjerenja u djece s AITP nije pokazivao značajnu povezanost s apsolutnim brojem limfocita, postotkom cirkulirajućih limfocita T, B, T8 i NK stanica.

U odraslih bolesnika broj trombocita u perifernoj krvi pri dijagnozi nije pokazivao značajnu povezanost s postotkom cirkulirajućih limfocita T i T4, ali je pokazivao značajnu pozitivnu povezanost s postotkom cirkulirajućih limfocita B, T8 i NK stanica i značajnu negativnu povezanost s apsolutnim brojem limfocita ( $p = 0,003$ ). Broj trombocita nakon 8 tjedana pokazivao je značajnu negativnu povezanost s postotkom cirkulirajućih NK stanica pri dijagnozi ( $p = 0,039$ ). Iz rezultata je vidljivo da će u odraslih broj trombocita biti veći ako je apsolutni broj limfocita pri dijagnozi niži, a postotak limfocita B, T8 i NK stanica viši. Ovo saznanje je korišteno u odabiru prediktora u odraslih bolesnika i analizi modelom višestruke regresije, što do sada nije opisano u literaturi.

Limfociti T4 i T8 mogu u različitim okolnostima proizvoditi različite citokine i podjednako su važni u imunom odgovoru. U djece je dokazana značajno pozitivna povezanost limfocita T sa serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$ , a značajno negativna limfocita B sa serumskim koncentracijama IL-6 i IL-10. Značajnu pozitivnu povezanost u djece s AITP pokazivali su limfociti T4 s IL-1 $\alpha$  kao i limfociti T8 s IL-4.

Limfociti T8 proizvode Th1 i Th2 tip citokina i važni su u regulaciji imunog odgovora. Hoiden i suradnici su ispitivali postotak limfocita T4 i T8 u slezeni nakon stimulacije superantigenom. Dokazali su da IL-4 nastaje isključivo iz limfocita T4, dok su u više od 80% slučajeva IL-10 i IFN- $\gamma$  proizvodili limfociti T8 (248).

U djece s AITP NK stanice su pokazivale značajnu pozitivnu povezanost s IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$  i IL-6 i značajnu negativnu povezanost s IL-1 $\alpha$ . Jewett i suradnici su istraživali djelovanje citokina IL-12 koji može aktivirati citotoksičnu funkciju NK stanica. Dokazali su da je ova aktivacija ovisna o endogenom lučenju TNF- $\alpha$  i potisnuta endogenim lučenjem IFN- $\gamma$ . U ovu aktivaciju nezrelih NK stanica može biti djelomično uključen i IL-2 uz inhibiciju anti-TNF- $\alpha$  protutijelima, ali ne i lučenjem IFN- $\gamma$  (249).

U odraslih ispitanika limfociti T su pokazivali značajnu pozitivnu povezanost s IL-3 i IL-10, a cirkulirajući limfociti B s IL-4 i značajnu negativnu povezanost s IFN- $\gamma$ . Značajna pozitivna povezanost uočena je između postotka cirkulirajućih limfocita T4 i IL-10, a NK stanica s IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$ . NK stanice mogu izlučivati različite citokine koji sudjeluju u aktivaciji nezrelih stanica, a izlučivanje je vezano uz stupanj zrelosti NK stanica (250).

Liječenje IVIG-om može modulirati Th1/Th2 ravnotežu. Yamada sa suradnicima je pokazao da infuzije IVIG-a mogu povisiti koncentracije citokina IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (Th1 citokini) i IL-4 i IL-10 (Th2 citokini) u perifernoj krvi i smanjiti Th1/Th2 odnos limfocita. Visoke doze IVIG-a mogu promijeniti perifernu Th1/Th2 ravnotežu (251).

Dvije trećine djece imaju u anamnezi preboljelu infektivnu bolest nekoliko dana ili tjedana prije nastanka AITP. Iz prezentiranih rezultata je vidljivo da je pozitivna IgM serumska protutijela na neki od odabranih virusa imalo 33 (59%) bolesnika. Sveukupno je bilo 7 (12%) bolesnika, koji su imali pozitivna IgM serumska protutijela istovremeno na dva ili više virusa.

Molekularna mimikrija između viralnih antigena i proteina domaćina možda je uzrokom nastanka protutijela u AITP (137,138), međutim izgleda da infekcija nekim od virusa nije najvažniji čimbenik u nastanku bolesti.

Serološki potvrđenu akutnu EBV infekciju imalo je 9 (16%) djece i odraslih, a akutnu serološki dokazanu HHV-6 infekciju 11 (22%) bolesnika od toga 8 (20%) djece i 3 (17%) odrasla. Serološki dokazanu akutnu infekciju adenovirusom imalo je 14 (25%) bolesnika, od toga 11 (28%) djece i 3 (18%) odraslih s AITP, dok je serološki dokazanu akutnu infekciju parvovirusom B19 imalo troje djece i jedan odrasli (7%).

Malo je izvještaja u literaturi o utjecaju virusne infekcije na poremećaj u citokinskoj mreži općenito. Kerr sa suradnicima opisuje povećane serumske koncentracije TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  u bolesnika s parvovirus B19 infekcijom, a Corcoran sa suradnicima je dokazao da limfociti u odraslih bolesnika koji se oporavljaju od iste infekcije pojačano stvaraju IL-2 i IFN- $\gamma$ , za razliku od djece u koje je primijećen značajan deficit stvaranja IFN- $\gamma$ . Autori smatraju da neke autoimune bolesti vezane uz parvovirus B19 infekciju nastaju zbog poremećaja u ravnoteži citokina (252,253). Flamad sa

suradnicima je istraživao utjecaj HHV-6 na sintezu citokina i dokazao da ovaj virus ima snažan imunomodulatorni utjecaj stimulirajući stanice na stvaranje citokina (19,20).

Važno je istaknuti da je dokazana značajna povezanost serumskih koncentracija citokina i serumskih IgM protutijela na pojedine viruse u djece i odraslih. U djece serumska EBV EA IgM protutijela pokazivala su značajnu pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-10, IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$ . Serumska EBV EA IgG protutijela pokazivala su značajnu pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-4, a negativnu s TNF- $\alpha$ , dok su EBV VCA IgM serumska protutijela pokazivala značajnu pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-4, a negativnu s TNF- $\alpha$ .

HHV-6 IgG serumska protutijela pokazivala su značajnu pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-10 u djece s AITP, a serumska adenovirus IgM protutijela značajnu pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-2, IL-10 i IFN- $\alpha$ , a značajnu negativnu s IL-1 $\alpha$ . Serumska parvovirus B19 IgM protutijela značajno su pozitivno bila povezana sa serumskim koncentracijama TNF- $\alpha$ .

U odraslih s AITP serumska protutijela EBV EA IgM pokazivala su značajnu pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , EBV EA IgG s TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . Serumska protutijela EBV VCA IgM pokazivala su značajnu negativnu povezanost s IL-2, IL-6 i pozitivnu s IFN- $\alpha$ . Serumska protutijela EBV VCA IgG pokazivala su značajnu negativnu povezanost sa serumskim koncentracijama TNF- $\alpha$ . Serumska protutijela IgG na HHV-6 virus pokazivala su značajnu pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$  i IFN- $\alpha$ , a značajnu negativnu s IL-2. Adenovirus IgM serumska protutijela pokazivala su značajnu negativnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-2. Serumska parvovirus B19 IgM protutijela pokazivala su značajnu pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-4.

Evidentno je da postoji značajna povezanost koncentracija serumskih citokina s pojavom protutijela na viruse u bolesnika s AITP što do sada nije opisano u literaturi. Svakako će ovo saznanje biti predmetom brojnih znanstvenih istraživanja i rasprava da bi se ustanovio mehanizam djelovanja virusa na citokinsku mrežu u bolesnika s AITP.

Još uvijek je nemoguće predvidjeti da li će dijete ili odrasli razviti akutnu ili kroničnu AITP (254). Prezentirani su rezultati modela višestruke regresije, koji bi bio optimalan u predviđanju broja trombocita u perifernoj krvi 6 mjeseci od dijagnoze u

djece s AITP i broja trombocita u perifernoj krvi nakon 8 tjedana od dijagnoze u odraslih s AITP.

Pomoću modela višestruke regresije možemo s 95,3% vjerojatnosti prognozirati broj trombocita u perifernoj krvi 6 mjeseci od dijagnoze pomoću pet regresorskih varijabli, koje utječu na broj trombocita u perifernoj krvi djece nakon 6 mjeseci od dijagnoze. To su serumske koncentracije IL-3, IL-4, TNF- $\alpha$  i postotak cirkulirajućih limfocita T4 pri dijagnozi kao i broj trombocita u perifernoj krvi nakon 8 tjedana. Znajući vrijednost varijabli prediktora serumskih koncentracija IL-3, IL-4, TNF- $\alpha$  i postotak limfocita T4 u krvi mjerenih pri dijagnozi kao i broj trombocita mjeren nakon 8 tjedana možemo upotrijebiti jednadžbu višestruke regresije. Broj trombocita u perifernoj krvi nakon 6 mjeseci od dijagnoze pokazivao je značajnu pozitivnu povezanost s IL-3/1 ( $p = 0,035$ ), postotkom cirkulirajućih limfocita T4 pri dijagnozi ( $p = 0,054$ ) i brojem trombocita u perifernoj krvi nakon 8 tjedana ( $p = 0,005$ ), a značajnu negativnu s IL-4/1 ( $p = 0,035$ ) i TNF- $\alpha$ /1 ( $p = 0,048$ ). To znači da će u djece broj trombocita mjeren 6 mjeseci od dijagnoze biti veći ako su serumske koncentracije IL-3 i postotak cirkulirajućih limfocita T4 pri dijagnozi i broj trombocita mjerenih nakon 8 tjedana veći i ako su serumske koncentracije IL-4 i TNF- $\alpha$  pri dijagnozi manje, što do sada u literaturi nije opisano.

U odraslih četiri regresorske varijable koje utječu na broj trombocita u perifernoj krvi nakon 8 tjedana od dijagnoze su vrijednosti apsolutnog broja limfocita, postotak cirkulirajućih limfocita B, NK stanica i serumske koncentracije IFN- $\alpha$  pri dijagnozi. Znajući vrijednost varijabli prediktora upotrebom jednadžbe višestruke regresije možemo s 93,3% vjerojatnosti predvidjeti broj trombocita nakon 8 tjedana. Trombociti mjereni nakon 8 tjedana od dijagnoze značajno pozitivno koreliraju s apsolutnim brojem limfocita pri dijagnozi ( $p = 0,040$ ), a negativno s postotkom limfocita B pri dijagnozi ( $p = 0,028$ ). Negativna povezanost s NK stanicama ( $p = 0,112$ ) i pozitivna sa serumskim koncentracijama IFN- $\alpha$  pri dijagnozi ( $p = 0,268$ ) postoji, ali nije značajna. To znači da će u odraslih broj trombocita u perifernoj krvi 8 tjedana od dijagnoze biti veći ako je apsolutni broj limfocita i ako su serumske koncentracije IFN- $\alpha$  pri dijagnozi bili veći, a postotak cirkulirajućih limfocita B i NK stanica u krvi bili niži, što do sada u literaturi nije opisano.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Djeca s AITP pri dijagnozi su imala značajno veće serumske koncentracije IL-4 i značajno niže IL-2 i TNF- $\alpha$  od zdrave djece. Odrasli s AITP pri dijagnozi su imali značajno veće serumske koncentracije IL-1 $\alpha$  i IL-4, a značajno manje koncentracije IL-10 od zdravih ispitanika.
2. Djeca s AITP pri dijagnozi su imala značajno niže serumske koncentracije IL-4, IL-6 i IFN- $\gamma$ , a značajno više IFN- $\alpha$  od odraslih s AITP.
3. Značajno su se promijenile serumske koncentracije IL-4, IL-6, IL-10 i TNF- $\alpha$  u djece u vremenu do 6 mjeseci od dijagnoze. Serumske koncentracije IL-4 i IL-6 su nakon 6 mjeseci bile značajno veće, a serumske koncentracije IL-10 i TNF- $\alpha$  značajno niže od onih pri dijagnozi. Značajnih promjena nije bilo u serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  u djece i IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  u odraslih s AITP.
4. U djece s AITP broj trombocita u perifernoj krvi pri dijagnozi bio je značajno negativno povezan, a broj trombocita nakon 6 mjeseci značajno pozitivno povezan sa serumskim koncentracijama IL-3 pri dijagnozi. U odraslih broj trombocita određen nakon 6 mjeseci od dijagnoze u perifernoj krvi je pokazivao značajno pozitivnu povezanost sa serumskim koncentracijama IL-4, a značajno negativnu povezanost s IFN- $\gamma$  i IL-3.
5. Pri dijagnozi između zdravih ispitanika i onih s akutnom i kroničnom AITP nije bilo značajne razlike u serumskim koncentracijama IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-6, IL-10 i IFN- $\gamma$ . Serumske koncentracije IL-4 i IFN- $\alpha$  bile su značajno veće u bolesnika s kroničnom AITP, dok su serumske koncentracije TNF- $\alpha$  bile značajno manje u bolesnika s akutnom AITP.
6. U djece s AITP broj trombocita u perifernoj krvi nije bio značajno povezan s apsolutnim brojem limfocita, postotkom limfocita T, B, T4, T8 i NK stanica za razliku od odraslih u kojih je bio značajno pozitivno povezan s postotkom cirkulirajućih limfocita B, T8 i NK stanica, a značajno negativno s apsolutnim brojem limfocita pri dijagnozi. U djece je dokazana značajna povezanost limfocita T s IL-1 $\alpha$ , limfocita B s

IL-6 i IL-10, limfocita T4 s IL-1 $\alpha$ , T8 s IL-4, a NK stanica s IL-2, IL-10, IL-6 i TNF- $\alpha$ , a u odraslih limfocita T s IL-3 i IL-10, limfocita B s IL-4 i IFN- $\gamma$ , T4 s IL-10, a NK stanica s IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$ .

7. Serološki je dokazana akutna virusna infekcija u 59% bolesnika s AITP (16% EBV, 22% HHV-6, 25% adenovirus i 7% parvovirus B19).
8. U djece je dokazana značajna pozitivna povezanost serumskih koncentracija IL-10, IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha$  i pojave serumskih protutijela EBV EA IgM, IL-4 i EBV EA IgG, kao i negativna povezanost EBV EA IgG s TNF- $\alpha$ . EBV VCA IgM protutijela su pokazivala značajno pozitivnu povezanost s IL-4, a negativnu s TNF- $\alpha$ . HHV-6 IgG protutijela pokazivala su značajno pozitivnu povezanost s IL-10, a adenovirus IgM značajno pozitivnu s IL-2, IL-10 i IFN- $\alpha$ , a negativnu s IL-1 $\alpha$ . Dokazana je značajno pozitivna povezanost parvovirus B19 IgM protutijela s TNF- $\alpha$ .
9. U odraslih EBV EA IgM i IgG protutijela pokazivala su značajno pozitivnu povezanost s TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , dok su EBV VCA IgM pokazivala značajno negativnu povezanost s IL-2, IL-6, a pozitivnu s IFN- $\alpha$ . EBV VCA IgG protutijela pokazivala su značajno negativnu povezanost s TNF- $\alpha$ , dok su HHV-6 IgG pokazivala značajno pozitivnu povezanost s IL-1 $\alpha$  i IFN- $\alpha$ , a značajno negativnu s IL-2. Dokazana je značajno negativna povezanost adenovirus IgM protutijela s IL-2 i značajno pozitivna parvovirus B19 IgM s IL-4.
10. U djece s AITP, znajući vrijednost varijabli prediktora serumskih koncentracija IL-3, IL-4, TNF- $\alpha$  i postotak cirkulirajućih T4 mjenjenih pri dijagnozi, kao i broj trombocita u perifernoj krvi mjenjenih nakon 8 tjedana, možemo prognozirati broj trombocita u perifernoj krvi 6 mjeseci nakon dijagnoze. U odraslih s AITP, znajući vrijednosti varijabli prediktora apsolutnog broja limfocita, postotka limfocita B, NK stanica i serumskih koncentracija IFN- $\alpha$  pri dijagnozi, možemo prognozirati broj trombocita u perifernoj krvi nakon 8 tjedana od dijagnoze. Pri tome možemo upotrijebiti jednadžbu višestruke regresije.

## 7. SAŽETAK

**Uvod:** AITP je uzrokovana neadekvatnim imunim odgovorom nejasne etiologije. Trombociti obloženi protutijelima uklanjaju se iz cirkulacije pomoću monocitno makrofagnog sustava zbog čega kraće žive. Jedan od mogućih etioloških čimbenika je poremećaj ravnoteže citokina, koji je zamijećen u tih bolesnika.

**Ciljevi:** Odrediti da li je imunosni defekt povezan sa serumskim koncentracijama citokina u djece i odraslih s akutnom AITP. Usporediti citokine pri dijagnozi u ispitanika međusobno i prema kontrolnoj skupini i odrediti promjene nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u oboljele djece i odraslih. Utvrditi povezanost razine citokina s prisustvom protutijela za CMV, EBV, HHV-6, adenovirus i parvovirus B19 i razine citokina s apsolutnim brojem limfocita, postotkom limfocita T, B, T4, T8 i NK stanica u oboljele djece i odraslih. Odrediti prognostičke vrijednosti razine citokina u odnosu na prelazak bolesti u kronični oblik u djece i odraslih.

**Ispitanici:** Ispitivano je 48 djece i 19 odraslih s AITP. Kontrolnu skupinu sačinjavalo je 26 zdrave djece, te 24 zdrava odrasla.

**Metode:** Koncentracije citokina IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , protutijela na CMV, EBV, HHV-6, adenovirus i parvovirus B19 su određeni u testu ELISA; apsolutni broj limfocita, postotak cirkulirajućih limfocita T, B, T4, T8 i NK stanice analizirani su pomoću protočnog razvrstavača stanica u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi. Rezultati su analizirani pomoću statističkih programa SPSS 11.0 PC i Statistica 6.0. Studentov *t*-test s logaritamski transformiranim varijablama korišten je za usporedbu rezultata. Citokini i trombociti su mjereni pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci, a za evaluaciju promjena korišten je Friedmanov test. Pearsonov koeficijent korelacije i model višestruke regresije primijenjen je u predviđanju broja trombocita. Kao razina značajnosti korištena je vrijednost  $p < 0,05$ .

**Rezultati:** Koncentracije IL-2 ( $p = 0,021$ ), TNF- $\alpha$  ( $p = 0,009$ ) u djece i IL-10 ( $p = 0,041$ ) u odraslih su bile niže, a IL-4 ( $p = 0,062$ ) u djece i IL-1 $\alpha$  ( $p = 0,045$ ) u odraslih su bile više od kontrolne skupine. Djeca s AITP su imala niži IL-4 ( $p = 0,033$ ), IL-6 ( $p = 0,004$ ) IFN- $\gamma$  ( $p = 0,001$ ), a viši IFN- $\alpha$  ( $p = 0,007$ ) od odraslih. Limfociti T4 u 52,6% djece i 27,6% odraslih su bili sniženi. Broj trombocita u djece nakon 6 mjeseci bi se mogao predvidjeti pomoću broja trombocita nakon 8 tjedana, a IL-3, IL-4 i TNF- $\alpha$  pri dijagnozi.

U odraslih bi se nakon 8 tjedana broj trombocita mogao predvidjeti pomoću IFN- $\alpha$ , apsolutnog broja limfocita, postotka limfocita B i NK stanica.

**Zaključak:** U patogenezi AITP, pored autoprotutijela, sudjeluju i pomoćnički limfociti T, kao i citokini koje oni luče .

## 8. SUMMARY

**Background:** The etiology of AITP is unknown and it is caused by an inappropriate response of the immune system. Antibody-coated platelets are removed from circulation by the monocytic phagocytic system, resulting in a shortened platelet survival.

**Aims:** This study was designed to determine if these defects are related to serum cytokine levels, to evaluate the differences in serum cytokines between children and adults, to determine the correlation between cytokine serum concentrations and circulating lymphocytes, and antibodies to viruses.

**Subjects:** The study population consisted of 48 children and 26 healthy controls, 19 adults with AITP and 24 healthy controls.

**Methods:** Serum concentrations of IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ , antibodies against CMV, EBV, HHV-6, adenovirus and parvovirus B19 were all determined by ELISA; absolute lymphocyte count, percentage of circulating lymphocyte T, B, T4, T8 and NK cells by flow cytometric analysis were measured in children and adults with AITP at diagnosis. Data were analyzed by SPSS 11.0 PC and Statistica 6.0 statistical programs. Student's *t*-test with logarithmic transformation comparing the data on cytokine levels was performed. Cytokines and platelets were measured at diagnosis, after 8 weeks and after 6 months while the Friedman test evaluated the changes. Pearson's correlation coefficients and multiple regression analysis were used to predict the platelet values (after 6 months in children, after 8 weeks in adults). A  $p < 0,05$  value was considered as statistically significant.

**Results:** Concentrations of IL-2 ( $p = 0,021$ ), TNF- $\alpha$  ( $p = 0,009$ ) in children and IL-10 ( $p = 0,041$ ) in adult patients were lower, while IL-4 ( $p = 0,062$ ) in children and IL-1 $\alpha$  ( $p = 0,045$ ) in adults were higher, compared to healthy controls. Children with AITP had lower IL-4 ( $p = 0,033$ ), IL-6 ( $p = 0,004$ ) and IFN- $\gamma$  ( $p = 0,001$ ), and higher IFN- $\alpha$  ( $p = 0,007$ ) than adults. Th lymphocytes in 52,6% children and 27,6% adults were low. The research revealed that after 6 months the number of platelets in children could be predicted by the number of platelets after 8 weeks and IL-3, IL-4 and TNF- $\alpha$  at diagnosis. After 8 weeks the number of platelets in adults could be predicted by absolute lymphocyte count, B-lymphocytes, NK cells and IFN- $\alpha$  at diagnosis.

**Conclusion:** Although the immunopathogenesis of AITP is autoantibody-mediated, there is now evidence that T helper cells and the cytokines they produce are involved.

## 9. LITERATURA

1. George JN, el Harake MA, Aster RH. Thrombocytopenia due to enhanced platelet destruction by immunologic mechanisms, U: Beutler E, Lichtmann MA, Coller BS, Kipps TJ, ur. Williams Hematology. New York, NY, McGraw-Hill, 1995;1315.
2. Minchinton R, Blanchette V, Imbach P, Akatsuka JI, Nugent D. International Study on EARLY CHRONIC ITP in Children and Adolescents. ITP Staging. 1995; Appendix 3.
3. Kühne T, Imbach P, Bolton-Maggs PHB, Berchtold W, Blanchette V, Buchanan GR et al. Newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood: an observational study. Lancet 2001;358:2122-5.
4. George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ et al. Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: A Practice Guideline Developed by Explicit Methods for The American Society of Hematology. Blood 1996;88:3-40.
5. Semple JW, Milev Y, Cosgrave D, Mody M, Hornstein A, Blanchette V et al. Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: Relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity. Blood 1996;87:4245-54.
6. Semple JW, Freedman J. Abnormal cellular immune mechanisms associated with autoimmune thrombocytopenia. Transfus Med Rev 1995;9:327-38.
7. Chang M, Suen Y, Meng G, Buzby JS, Bussel J, Shen V et al. Differential mechanisms in the regulation of endogenous levels of thrombopoietin and interleukin-11 during thrombocytopenia: insight into the regulation of platelet production. Blood 1996;88:3354-62.
8. Gamulin S, Marušić M, Krvavica S i sur. Patofiziologija. Medicinska naklada Zagreb 1995;280-92.
9. Bendtzen K. Immune hormones (cytokines); pathogenic role in autoimmune rheumatic diseases and endocrine diseases. Autoimmunity 1989;2:177-89.
10. Campbell IL, Kay TW, Oxbrow L, Harrison LC. Essential role for interferon- $\gamma$  and interleukin 6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice. J Clin Invest 1991;87:739-42.

11. Morel PA, Oriss TB. Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Crit Rev Immunol* 1998;18:275-303.
12. Raveh D, Kruskal BA, Farland J, Ezekowitz RA. Th1 and Th2 Cytokines Cooperate to Stimulate Mannose-Receptor-Mediated Phagocytosis. *J Leukoc Biol* 1998;64:108-13.
13. van der Graaff WL, Prins AP, Dijkmans BA, van Lier RA. Prognostic value of Th1/Th2 ratio in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1998;351:1931.
14. Cohen JI. Epstein-Barr Virus and the Immune System: Hide and Seek. *JAMA* 1997;278:510-3.
15. Marchini B, Dolcher MP, Sabbatini A, Klein G, Migliorini P. Immune response to different sequences of the EBNA i molecule in Epstein-Barr virus-related disorders and in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 1994;7:179-91.
16. Vaughan JH, Nguyen MD, Valbracht JR, Patrick K, Rhodes GH. Epstein-Barr Virus-induced autoimmune responses. Immunoglobulin G autoantibodies to mimicking and nonmimicking epitopes. Presence in autoimmune disease. *J Clin Invest* 1995;95:1316-27.
17. Čulić S, Meštrović J, Martinić R: Immunologic disturbances as the consequences of the Epstein Barr virus (EBV) infection. *Period Biol* 1990;92:61.
18. Kawa-Ha K, Franco E, Doi S, Yomura K, Ishihara S, Tawa A et al. Successful treatment of chronic active Epstein-Barr virus infection with recombinant interleukin-2. *Lancet* 1987;1:154.
19. Flamand L, Gosselin J, Stefanescu I, Ablashi D, Menezes J. Immunosuppressive effect of Human Herpesvirus 6 on T-cell functions: Suppression of Interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood* 1995;85:1263-71.
20. Flamand L, Gosselin J, D'Addario M, Hiscott J, Ablashi DV, Gallo RC et al. Human herpesvirus 6 induces interleukin-1beta and tumor necrosis factor alfa, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Virol* 1991;65:5105-10.
21. Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* 1995;85:419-31.
22. Italiano JE, Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost* 2003;1:1174-82.



23. Harker LA. Therapeutic Cytokine Stimulation of Thrombocytopoiesis. *Transfus Sci* 1998;19:149-62.
24. Labar B, Hauptman E i sur. Trombociti. U: Hematologija. Školska knjiga Zagreb 1998. 43-7.
25. Liesner RJ, Machin SJ. ABC of clinical haematology: Platelet disorders. *BMJ* 1997;314:809-12.
26. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003;1:1335-42.
27. Delves PJ, Roitt IM. Advances in Immunology: The Immune System (First of Two Parts). *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
28. Mackay CR, von Andrian UH. Memory T Cells-Local Heroes in the Struggle for Immunity. *Science* 2001;291:2323-24.
29. Kemeny M, Peakman M. Recent advances: Immunology. *BMJ* 1998;316:600-3.
30. Germain RN. Immunology. The ins and out of antigen processing and presentation. *Nature* 1986;322:687-9.
31. Marrack P. New insights into antigen recognition. *Science* 1987;235:1311-3.
32. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
33. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 2001;3:947-54.
34. van der Graaff WL, Prins APA, Niers TMH, Dijkmans BAC, van Lier RAW. Quantitation of interferon gamma- and interleukin-4-producing T cells in sinovial fluid and peripheral blood of arthritis patients. *Rheumatology* 1999;38:214-20.
35. Daynes RA, Araneo BA, Dowell TA, Huang K, Dudley D. Regulation of murine lymphokine production in vivo:III, the lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. *J Exp Med* 1990;171:979-96.
36. Daynes RA, Araneo BA, Hennebold J, Enioutina J, Mu HH. Steroids as the regulators of mammalian immune response. *J Invest Dermatol* 1995;105:14S-19S.

37. Suzuki T, Suzuki N, Daynes RA, Engelman EG. Dehydroepiandrosterone enhances IL2 production and cytotoxic effector function of human T cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;61:202-11.
38. Van Parijs L, Abbas AK. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol* 1996;8:355-61.
39. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:255-60.
40. Labar B. Molekularna genetika-budućnost onkologije. *Medicus* 2001;10:141-5.
41. Shenoy S, Mohanakumar T, Chatila T, Tersak J, Duffy B, Wang R et al. Defective Apoptosis in Lymphocytes and the Role of IL-2 in Autoimmune Hematologic Cytopenias. *Clin Immunol* 2001;99:266-75.
42. Dinarello CA, Gelfand JA, Wolff SM. Anticytokine Strategies in the Treatment of the Systemic Inflammatory Response Syndrome. *JAMA* 1993;269:1829-35.
43. Modlin RL, Nutman TB. Type-2 Cytokines and Negative Immune Regulation in Human Infections. *Curr Opin Immunol* 1993;5:511-7.
44. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A et al. Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699-709.
45. Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today* 1997;18:231-40.
46. Matsushima K, Akahoshi T, Yamada M, Furutani Y, Oppenheim JJ. Properties of a specific interleukin 1 (IL 1) receptor on human Epstein Barr virus-transformed B lymphocytes: identity of the receptor for IL 1-alpha and IL1-beta. *J Immunol* 1986;136:4496-502.
47. Ghezzi P, Dinarello CA. IL-1 induces IL-1. III. Specific inhibition of IL-1 production by IFN-gamma. *J Immunol* 1988;140:4238-44.
48. Tilg H, Mier JW, Vogel W, Aulitzky WE, Wiedermann CJ, Vannier E et al. Induction of circulating IL-1 receptor antagonist by IFN treatment. *J Immunol* 1993;150:4687-92.

49. Lovett D, Kozan B, Hadam M, Resch K, Gemsa D. Macrophage cytotoxicity: interleukin 1 as a mediator of tumor cytostasis. *J Immunol* 1986;136:340-7.
50. Kaye J, Gillis S, Mizel SB, Shevach EM, Malek TR, Dinarello CA et al. Growth of a cloned helper T cell line induced by a monoclonal antibody specific for the antigen receptor: interleukin 1 is required for the expression of receptors for interleukin 2. *J Immunol* 1984;133:1339-45.
51. Koch AE, Kunkel SL, Strieter RM. Cytokines in rheumatoid arthritis. *J Invest Med* 1995;43:28-38.
52. Shingu M, Nagai Y, Isayama T, Naono T, Nobunaga M, Nagai Y. The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 1993;94:145-9.
53. MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts: synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. *J Biol Chem* 1990;265:17238-45.
54. Lipsky PE, Thompson PA, Rosenwasser LJ, Dinarello CA. The role of interleukin 1 in human B cell activation: inhibition of B cell proliferation and the generation of immunoglobulin-secreting cells by an antibody against human leucocytic pyrogen. *J Immunol* 1983;130:2708-14.
55. Lee SW, Tsou AP, Chan H, Thomas J, Petrie K, Eugui EM et al. Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 beta gene and decrease the stability of interleukin 1 beta mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1204-8.
56. Trotter JL, van der Veen RC, Clifford DB. Serial studies of serum interleukin-2 in chronic progressive multiple sclerosis patients: occurrence of 'bursts' and effects of cyclosporine. *J Neuroimmunol* 1990;28:9-14.

57. Tebib JG, Boughaba H, Letroublon MC, Bienvenu J, Noel E, Armanet P et al. Serum IL-2 level in rheumatoid arthritis: correlation with joint destruction and disease progression. *Eur Cytokine Netw* 1991;2:239-43.
58. Huang YP, Perrin LH, Miescher PA, Zubler RH. Correlation of T and B cell activities in vitro and serum IL-2 levels in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1988;141:827-33.
59. Liberman AC, Refojo D, Arzt E. Cytokine signaling/transcription factor cross-talk in T cell activation and Th1-Th2 differentiation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2003;51:351-65.
60. Seigel LJ, Harper ME, Wong-Staal F, Gallo RC, Nash WG, O'Brien SJ. Gene for T-cell growth factor: location on human chromosome 4q and feline chromosome B1. *Science* 1984;223:175-8.
61. Taniguchi T, Miyazaki T, Minami Y, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y et al. IL-2 signaling involves recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the IL-2 receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1995;766:235-44.
62. Akbar AN, Borthwick NJ, Wickremasinghe RG, Panayoitidis P, Pilling D, Bofill M et al. Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *Eur J Immunol* 1996;26:294-9.
63. Strasser A, Harris AW, Cory S. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 1991;67:889-99.
64. Sarvetnick N, Shizuru J, Liggitt D, Martin L, McIntyre B, Gregory A et al. Loss of pancreatic islet tolerance induced by  $\beta$ -cell expression of interferon- $\gamma$ . *Nature* 1990;346:844-7.
65. Abdel-Raheem MM, Potti A, Kobrinsky N. Severe Evans's syndrome secondary to interleukin-2 therapy: treatment with chimeric monoclonal anti-CD20 antibody. *Ann Hematol* 2001;80:543-5.
66. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990;265:621-36.

67. Vankelecom H, Carmeliet P, Van Damme J, Billiau A, Deneef C. Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology* 1989;49:102-6.
68. Ishibashi T, Kimura H, Uchida T, Kariyone S, Friese P, Burstein SA. Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5953-7.
69. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic Roles of Interleukin-6 in Human Disease. *Ann Intern Med* 1998;128:127-37.
70. Sehgal PB. Regulation of IL-6 gene expression. *Res Immunol* 1992;143:724-34.
71. Navarro S, Debili N, Le Couedic JP, Klein B, Breton-Gorius J, Doly J et al. Interleukin-6 and its receptor are expressed by human megakaryocytes: In vitro effects on proliferation and endoreplication. *Blood* 1991;77:461-71.
72. Lyson K, McCann SM. The effect of interleukin-6 on pituitary hormone release in vivo and in vitro. *Neuroendocrinology* 1991;54:262-6.
73. Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto S et al. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10193-7.
74. Akira S, Isshiki H, Nakajima T, Kinoshita S, Nishio Y, Hashimoto S et al. A nuclear factor for the IL-6 gene (NF-IL6). *Chem Immunol* 1992;51:299-322.
75. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The Pathophysiologic Roles of Interleukin-6 in Human Disease. *Ann Intern Med* 1998;128:127-37.
76. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986;324:73-6.
77. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993;54:1-78.

78. Asano S, Okano A, Ozawa K, Nakahata T, Ishibashi T, Koike H et al. In vivo effects of recombinant human interleukin-6 in primates: stimulated production of platelets. *Blood* 1990;75:1602-5.
79. Herodin F, Mestries JC, Jadonet D, Martin S, Mathieu J, Gascon MP et al. Recombinant glycosylated human interleukin-6 accelerates peripheral blood platelet count recovery in radiation-induced bone marrow depression in baboons. *Blood* 1992;80:688-95.
80. Demetri GD, Samuels B, Gordon M, Merica EA, Mazanet R, Antman KH et al. Recombinant human interleukin-6 (IL-6) increases circulating platelet counts and C-reactive protein levels in vivo: Initial results of a phase 1 trial in sarcoma patients with normal hemopoiesis. *Blood* 1992;80:88a.
81. Burstein SA, Downs T, Friese P, Lynam S, Anderson S, Henthorn J et al. Thrombocytopoiesis in normal and sublethally irradiated dogs: response to human interleukin-6. *Blood* 1992;80:420-8.
82. Peng J, Friese P, George JN, Dale GL, Burstein SA. Alteration of platelet function in dogs mediated by interleukin-6. *Blood* 1994;83:398-403.
83. Hill RJ, Warren MK, Levin J. Stimulation of thrombopoiesis in mice by human recombinant interleukin-6. *J Clin Invest* 1990;85:1242-7.
84. Peng J, Friese P, Heilmann E, George JN, Burstein SA, Dale GL. Aged platelets have an impaired response to thrombin as quantitated by P-selectin expression. *Blood* 1994;83:161-6.
85. Rock CS, Coyle SM, Keogh CV, Lazarus DD, Hawes AS, Leskiw M et al. Influence of hypercortisolemia on the acute-phase protein response to endotoxin in humans. *Surgery* 1992;112:467-74.
86. Teoh HT, Bradley CA, Gauldie J, Burrows H. Steroid Inhibition of Cytokine-Mediated Vasodilation After Warm Heart Surgery. *Circulation* 1995;92:II347-53.
87. Ryffel B, Car BD, Woerly G, Weber M, DiPadova F, Kammüller M et al. Long-term Interleukin-6 Administration Stimulates Sustained Thrombopoiesis and Acute-Phase Protein Synthesis in a Small Primate-The Marmoset. *Blood* 1994;83:2093-102.

88. Tosato G, Seamon KB, Goldman ND, Sehgal PB, May LT, Washington GC et al. Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon-beta 2 (BSF-2, IL-6). *Science* 1988;239:502-4.
89. Choj EHS, Panayi GS. Mechanisms of Disease: Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2001;344:907-16.
90. Alvarez-Hernandez X, Liceaga J, McKay IC, Brock JH. Induction of hypoferrremia and modulation of macrophage iron metabolism by tumor necrosis factor. *Lab Invest* 1989;61:319-22.
91. Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan FM. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF- $\alpha$  antibody with interleukin-1 receptor antagonist. *Eur Cytokine Netw* 1995;6:225-30.
92. Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:9784-8.
93. van Roon JA, van Roy JL, Gmeling-Meyling FH, Lafeber FP, Bijlsma JW. Prevention and reversal of cartilage degradation in rheumatoid arthritis by interleukin-10 and interleukin-4. *Arthritis Rheum* 1996;39:829-35.
94. Sugiyama E, Kuroda A, Taki H, Ikemoto M, Hori T, Yamashita N et al. Interleukin 10 cooperates with interleukin 4 to suppress inflammatory cytokine production by freshly prepared adherent rheumatoid synovial cells. *J Rheumatol* 1995;22:2020-6.
95. Chomarat P, Banchereau J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol* 1998;17:1-52.
96. Chomarat P, Banchereau J. An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw* 1997;8:333-44.
97. Suzuki H, Sugiyama E, Tunru IS, Yamashita N, Matsuno H, Hamazaki T et al. Suppressive effect of interleukin-4 (IL-4) on IL-6 production adherent rheumatoid synovial cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;66:67-72.
98. Santiago ML, Fossati L, Jacquet C, Müller, Izui S, Reininger L. Interleukin-4 Protects against a Genetically Linked Lupus-like Autoimmune Syndrome. *J Exp Med* 1997;185:65-70.

99. Martinez OM, Villaneueva JC, Lawrence-Miyasaki L, Quin MB, Cox K, Krams SM. Viral and immunologic aspect of Epstein-Barr virus infection in pediatric liver transplant recipients. *Transplantation* 1995;59:519-24.
100. Bober LA, Rojas-Triana A, Jackson JV, Leach MW, Manfra D, Narula SK et al. Regulatory effects of interleukin-4 and interleukin-10 on human neutrophil function ex vivo and on neutrophil influx in a rat model of arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2660-7.
101. Yamamoto T, Imoto S, Sekine Y, Sugiyama K, Akimoto T, Muraguchi A et al. Involvement of NF-kappaB in TGF-beta-mediated suppression of IL-4 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:627-34.
102. Sonoda Y, Kuzuyama Y, Tanaka S, Yokota S, Maekawa T, Clark SC et al. Human interleukin-4 inhibits proliferation of megakaryocyte progenitor cells in culture. *Blood* 1993;81:624-30.
103. Snoeck HW, Lardon F, Van Bockstaele DR, Peetermans ME. Effects of interleukin-4 on myelopoiesis: localization of the action of IL-4 in the CD34+HLA-DR++ subset and distinction between direct and indirect effects of IL-4. *Exp Hematol* 1993;21:635-9.
104. Rennick D, Berg D, Holland G. Interleukin 10: an overview. *Prog Growth Factor Res* 1992;4:207-27.
105. de Vaal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Frigidor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-20.
106. Howard M, O'Garra A, Ishida H, de Waal Malefyt R, de Vries J. Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol* 1992;12:239-47.
107. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wurthrich B, Blaser K. Role of Interleukin 10 in Specific Immunotherapy. *J Clin Invest* 1998;102:98-106.
108. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815-22.
109. Briere F, Bridon JM, Chevet D, Souillet G, Bienvenu F, Guret C et al. Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *J Clin Invest* 1994;94:97-104.



110. Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest* 1994;93:424-8.
111. Fluckiger AC, Garrone P, Durand I, Galizzi JP, Banchereau J. Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *J Exp Med* 1993;178:1473-81.
112. Powrie F, Menon S, Coffman RL. Interleukin-4 and Interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur J Immunol* 1993;23:2223-9.
113. Taga K, Chretien J, Cherney B, Diaz L, Brown M, Tosato G. Interleukin-10 Inhibits Apoptotic Cell Death in Infectious Mononucleosis T Cells. *J Clin Invest* 1994;94:251-60.
114. Corinti S, Albanesi C, Ia Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* 2001;166:4312-8.
115. Fukao T, Frucht DM, Yap G, Gadina M, O'Shea JJ, Koyasu S. Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J Immunol* 2001;166:4446-55.
116. Young JL, Libby P, Schönbeck. Cytokines in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2002;88:554-67.
117. Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH et al. Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediator of apoptosis. *Apoptosis* 2003;8:237-49.
118. Raefsky EL, Plataniias LC, Zoumbos NC, Young NS. Studies of interferon as the regulator of hematopoietic cell proliferation. *J Immunol* 1985;135:2507-12.
119. Colonna M, Krug A, Cella M. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr Opin Immunol* 2002;14:373-9.
120. Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu Yj. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2000;192:219-26.
121. Belardelli F, Gresser I. The neglected role of type I interferon in the T-cell response: implications for its clinical use. *Immunol Today* 1996;17:369-72.
122. Hilkens CM, Schlaak JF, Kerr IM. Differential Responses to IFN-alpha Subtypes in Human T Cells and Dendritic Cells. *J Immunol* 2003;171:5255-63.
123. Balkwill FR. Interferons. *Lancet* 1989;1:1060-3.

124. Prabhu A, Warwick M, Mathur A. Decreased levels of circulating interferon-alpha and increased sCD23 in patients with acute infectious mononucleosis. *Viral Immunol* 1996;9:45-50.
125. Nishida Y, Maeda Y, Hara A, Arima T, Kimura E, Yamashita S et al. Adenovirus-Mediated Murine Interferon-gamma Receptor Transfer Enhances the Efficacy of IFN-gamma in Vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:1042-47.
126. Bernabei P, Allione A, Rigamonti L, Bosticardo M, Losana G, Berghi I et al. Regulation of interferon-gamma receptor (IFN- $\gamma$  R) chains: a peculiar way to rule the life and death of human lymphocytes. *Eur Cytokine Netw* 2001;12:6-14.
127. Allende LM, López-Goyanes A, Paz-Artal E, Corell A, Garcia-Pérez A, Varela P et al. A Point Mutation in a Domain of Gama Interferon Receptor 1 Provokes Severe Immunodeficiency. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:133-7.
128. Means RT, Dessypris EN, Krantz SB. Inhibition of human colony-forming unit erythroid by tumor necrosis factor requires accessory cells. *J Clin Invest* 1990;86:538-41.
129. Means RT, Dessypris EN, Krantz SB. Inhibition of human colony-forming unit erythroid by interleukin-1 is mediated by gamma interferon. *J Cell Physiol* 1992;150:59-64.
130. Hsu DH, Moore KW, Spits H. Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int Immunol* 1992;4:563-9.
131. Sonoda Y, Yang YC, Wong GG, Clark SC, Ogawa M. Analysis in serum-free culture of the targets of recombinant human hemopoietic growth factors: interleukin 3 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor are specific for early developmental stages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:4360-4.
132. Ikebuchi K, Ihle JN, Hirai Y, Wong GG, Clark SC, Ogawa M. Synergistic factors for stem cell proliferation: further studies of the target stem cells and the mechanism of stimulation by interleukin-1, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1988;72:2007-14.

133. Warren DJ, Moore MA. Synergism among interleukin 1, interleukin 3, and interleukin 5 in the production of eosinophils from primitive hemopoietic stem cells. *J Immunol* 1988;140:94-9.
134. Chen BD, Clark CR. Interleukin 3 (IL 3) regulates the in vitro proliferation of both blood monocytes and peritoneal exudate macrophages: synergism between a macrophage lineage-specific colony-stimulating factor (CSF-1) and IL 3. *J Immunol* 1986;137:563-70.
135. Schmitz B, Wickenhauser C, Thiele J, Frimpong S, Brockbals C, Selbach B et al. Megakaryocyte induced fibroblast proliferation is enhanced by costimulation with IL-6/IL-3 and dependent on secretory and adhesion events. *Leuk Res* 1999;23:723-29.
136. Hirayama F, Ogawa M. Cytokine regulation of early B-lymphopoiesis assessed in culture. *Blood Cells* 1994;20:341-6; discussion 346-7.
137. Rand ML, Wright JF. Virus-associated Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Transfus Sci* 1998;19:253-59.
138. Rand ML, Wright JF, Blanchette VS. Platelet-reactive antibodies in children with immune thrombocytopenic purpura (ITP) associated with Epstein-Barr virus (EBV) infection. *Blood* 1996;88:516a.
139. Momin F, Chandrasekar PH. Antimicrobial Prophylaxis in Bone Marrow Transplantation. *Ann Intern Med* 1995;123:205-15.
140. Clizer EE. Cytomegalovirus mononucleosis. *JAMA* 1974;228:606.
141. Chou SW. Acquisition of donor strains of cytomegalovirus by renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 1986;314:1418-23.
142. Chou SW. Reactivation and recombination of multiple cytomegalovirus strains from individual organ donors. *J Infect Dis* 1989;160:11-5.
143. Tegtmeier GE. Cytomegalovirus infection as a complication of blood transfusion. *Semin Liver Dis* 1986;6:82-95.
144. Gnann J.Jr, Ahlmen J, Svalander C, Olding L, Oldstone MB, Nelson JA. Inflammatory cells in transplanted kidney are infected by human cytomegalovirus. *Am J Pathol* 1988;132:239-48.

145. Soderberg C, Larsson S, Bergstedt-Lindqvist S, Moller E. Definition of a subset of human peripheral blood mononuclear cells that are permissive to human cytomegalovirus infection. *J Virol* 1993;67:3166-75.
146. Link H, Battmer K, Stumme C. Cytomegalovirus infection in leucocytes after bone marrow transplantation demonstrated by mRNA in situ hybridization. *Br J Hematol* 1993;85:573-7.
147. von Laer D, Serr A, Meyer-Konig U, Kirste G, Hufert FT, Haller O. Human cytomegalovirus immediate early and late transcripts are expressed in all major leukocyte populations in vivo. *J Infect Dis* 1995;172:365-70.
148. Sinzger C, Plachter B, Stenglein S, Jahn G. Immunohistochemical detection of viral antigens in smooth muscle, stromal, and epithelial cells from acute human cytomegalovirus gastritis. *J Infect Dis* 1993;167:1427-32.
149. Sinzger C, Munteferig H, Loning T, Stoss H, Plachter B, Jahn G. Cell types infected in human cytomegalovirus placentitis identified by immunohistochemical double staining. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;423:249-56.
150. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964;1:702-3.
151. Krieger NR, Martinez OM, Krams SM, Cox K, So S, Esquivel CO. Significance of detecting Epstein-Barr-specific sequences in the peripheral blood of asymptomatic pediatric liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2000;6:62-6.
152. Niedobitek G, Agathangelou A, Herbst H, Whitehead L, Wright DH, Young LS. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Patol* 1997;182:151-9.
153. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 1998;9:395-404.
154. Birx DL, Redfield RR, Tosato G. Defective regulation of Epstein-Barr virus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related disorders. *N Engl J Med* 1986;314:874-9.
155. Li Q, Spriggs MK, Kovats S, Turk SM, Comeau MR, Nepom B et al. Epstein-Barr virus uses HLA class II as the cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* 1997;71:4657-62.

156. Straus SE, Cohen JI, Tosato G, Meier J. Epstein-Barr virus infection: biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med* 1992;118:45-58.
157. Horwitz CA, Henle W, Henle G, Rudnick H, Latts E. Long term serological follow up of patients for Epstein-Barr virus after recovery from infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 1985;151:1150-3.
158. Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 1990;248:1230-4.
159. Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF, Dang MN, Vieira P, de Vries J et al. Expression of interleukin 10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* 1990;250:830-2.
160. Mogensen TH, Paludan SR. Molecular pathways in virus-induced cytokine production. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;65:131-50.
161. Gregory CD, Murray RJ, Edwards CF, Rickinson AB. Downregulation of cell adhesion molecules LFA-3 and ICAM-1 in Epstein-Barr virus-positive Burkitt's lymphoma underlies tumor cell escape from virus-specific T cell surveillance. *J Exp Med* 1988;167:1811-24.
162. Moss DJ, Rickinson AB, Wallace LE, Epstein MA. Sequential appearance of Epstein-Barr virus nuclear and lymphocyte-detected membrane antigens in B cell transformation. *Nature* 1981;291:664-6.
163. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M et al. Isolation of a new virus HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 1986;234:596-601.
164. Lawrence GL, Chee M, Craxton MA, Gompels UA, Honess RW, Barel B, BG. Human herpesvirus 6 is closely related to human cytomegalovirus. *J Virol* 1990;64:287-99.
165. Yoshikawa T, Asano Y. Central nervous system complications in human herpesvirus-6 infection. *Brain Dev* 2000;22:307-14.
166. Lusso P, Ensoli B, Markham PD, Ablashi DV, Salahuddin SZ, Tschachler E et al. Productive dual infection of human CD4+ T lymphocytes by HIV-1 and HHV-6. *Nature* 1989;337:370-3.

167. Kondo K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, Yamanishi K. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol* 1991;72:1401-8.
168. Lusso P, Malnati MS, Garzino-Demo A, Crowley RW, Long EO, Gallo RC. Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature* 1993;362:458-62.
169. Dewhurst S, Skrinicosky D, van Loon N. Human herpesvirus 6. *Expert Rev Mol Med* 1997;1:1-17.
170. Dockrell DH. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical feature. *J Med Microbiol* 2003;52:5-18.
171. Flamand L, Gosselin J, Stefanescu I, Ablashi D, Menezes J. Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood* 1995;85:1263-71.
172. Gosselin J, Flamand L, D'Addario M, Hiscott J, Stefanescu I, Ablashi DV et al. Modulatory effects of Epstein-Barr, herpes simplex, and human herpes-6 viral infections and coinfections on cytokine synthesis. A comparative study. *J Immunol* 1992;149:181-7.
173. Ma XT, Song YH, Lu DM, Mu GF, Li G, Ji LX et al. Human herpesvirus 6 in hematologic diseases in China. *Haematologica* 2000;85:458-63.
174. Yoshikawa T, Morooka M, Suga S, Niinomi Y, Kaneko T, Shinoda K et al. Five cases of thrombocytopenia induced by human herpesvirus 6 infection. *Acta Paediatr Jpn* 1998;40:278-81.
175. Olive M, Eisenlohr LC, Flomenberg P. Quantitative analysis of adenovirus-specific CD4+ T-cell responses from healthy adults. *Viral Immunol* 2001;14:403-13.
176. Avellon A, Pérez P, Aguilar JC, de Lejarazu RO, Echevarría JE. Rapid and sensitive diagnosis of human adenovirus infections by a generic polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2001;92:113-20.
177. Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1975;1:72-3.
178. Anderson MJ, Jones SE, Fisher-Hoch SP, Lewis E, Hall SM, Bartlett CL et al. Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (Fifth disease)? (letter). *Lancet* 1983;1:1378.

179. China B, Ramirez Ronda CH. Infections caused by parvovirus B19. *Bol Asoc Med P R* 1996;88:20-6.
180. Nocton JJ, Miller LC, Tucker LB, Schaller JG. Human parvovirus B19-associated arthritis in children. *J Pediatr* 1993;122:186-90.
181. Reid DM, Reid TM, Brown T, Rennie JA, Eastmond CJ. Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. *Lancet* 1985;1:422-5.
182. Foreman NK, Oakhill A, Caul EO. Parvovirus-associated thrombocytopenic purpura. *Lancet* 1988;2:1426-7.
183. Lefrere JJ, Courouce AM, Kaplan C. Parvovirus and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Lancet* 1989;1:279.
184. Anderson MJ, Higgins PG, Davis LR, Willman JS, Jones SE, Kidd IM et al. Experimental parvoviral infection in humans. *J Infect Dis* 1985;152:257-65.
185. Inoue S, Kinra NK, Mukkamala SR, Gordon R. Parvovirus B-19 infection: aplastic crisis, erythema infectiosum and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:251-3.
186. Murray JC, Kelley PK, Hogrefe WR, McClain KL. Childhood idiopathic thrombocytopenic purpura: association with human parvovirus B19 infection. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1994;16:314-9.
187. Brown KE, Young NS. Parvovirus B19 infection and hematopoiesis. *Blood Rev* 1995;9:176-82.
188. Crowther JR. ELISA. Theory and Practice. *Methods Mol Biol* 1995;42:1-218.
189. Lehmann HW, Knöll A, Kuster RM, Modrow S. Frequent infection with a viral pathogen, Parvovirus B 19, in rheumatic diseases of childhood. *Arthritis Rheum* 2003;48:1631-8.
190. Simpson GR, Schulz TF, Whitby D, Cook PM, Boshoff C, Rainbow L et al. Prevalence of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet* 1996;348:1133-8.

191. Parks DR, Heerzenberg LA. Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting. U: Fundamental Immunology, 2. izd . W.E. Paul, ed. Raven Press Ltd, New York, 1989; 781-802.
192. Engelman L. Detailed data description including frequencies. In: Dixon WJ, ed. BMDP Statistical software Manual Berkeley, LA, Oxford: Univ. of Cal. Press.1990;Vol 1:135-45.
193. Engelman L. Stepwise logistic regression. In: Dixon WJ, ed. BMDP Statistical software Manual Berkeley, LA, Oxford: Univ. of Cal. Press.1990;Vol 1:1013-36.
194. Ivanković D i sur. Osnove statističke analize za medicinare. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta;1991:82-5.
195. Rozga A. Statistika za ekonomiste. Split: Ekonomski fakultet Sveučilita u Splitu;2003:183-222.
196. Silverman MA. Idiopathic thrombocytopenic purpura. Dostupno na: <http://www.emedicine.com/emerg/topic282.htm>.
197. Lilleyman JS. Management of childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 1999;105:871-5.
198. Reid MM. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: incidence, treatment, and outcome. Arch Dis Child 1995;72:125-8.
199. Portielje JE, Westendorp RG, Kluin-Nelemans HC, Brand A. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 2001;97:2549-54.
200. Blanchette V, Carcao M. Approach to the Investigation and Management of Immune Thrombocytopenic Purpura in Children. Semin Hematol 2000;37:299-314.
201. Bolton-Maggs PH. Idiopathic thrombocytopenic purpura. Arch Dis Child 2000;83:220-2.
202. Karpatkin S. Autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. Lancet 1997;349:1531-6.
203. Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas A. Biochemical mechanisms of IL-2 regulated Fas-mediated T cell apoptosis. Immunity 1998;8:615-23.



204. Shenoy S, Mohanakumar T, Chatila T, Tersak J, Duffy B, Wang R et al. Defective Apoptosis in Lymphocytes and the Role of IL-2 in Autoimmune Hematologic Cytopenias. *Clin Immunol* 2001;99:266-75.
205. Tebib JG, Boughaba H, Letroublon MC. Serum IL-2 level in rheumatoid arthritis. Correlation with joint destruction and disease progression. *Eur Cytokine Network* 1991;2:239-43.
206. Huang YP, Perrin LH, Miescher PA, Zubler RH. Correlation of T and B cell activities in vitro and serum IL-2 levels in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1991;141:827-33.
207. Trotter JL, van der Veen RC, Clifford DB. Serial studies of serum interleukin-2 in chronic progressive multiple sclerosis patients: occurrence of 'bursts' and effects of cyclosporine. *J Neuroimmunol* 1990;28:9-14.
208. Erduran E, Aslan Y, Aliyazicioglu Y, Mocan H, Gedik Y. Plasma soluble interleukin-2 receptor levels in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1998;57:119-23.
209. Debili N, Massé JM, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Vainchenker W. Effects of the recombinant hematopoietic growth factors interleukin-3, interleukin-6, stem cell factor, and leukemia inhibitory factor on the megakaryocytic differentiation of CD34+ cells. *Blood* 1993;82:84-95.
210. Yang M, Li K. The role of cytokines and transcription factors in megakaryocytopoiesis. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2002;10:580-5.
211. Bruno S, Gunetti M, Gammaitoni L, Dane A, Cavalloni G, Sanavio F et al. In vitro and in vivo megakaryocyte differentiation of fresh and ex-vivo expanded cord blood cells: rapid and transient megakaryocyte reconstitution. *Haematologica* 2003;88:379-87.
212. Webber NP, Mascarenhas JO, Crow MK, Bussel J, Schattner EJ. Functional properties of lymphocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Hum Immunol* 2001;62:1346-55.
213. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998;16:137-61.

214. Andersson PO, Stockelberg D, Jacobsson S, Wadenvik H. A transforming growth factor-beta1-mediated bystander immune suppression could be associated with remission of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol* 2000;79:507-13.
215. Inobe J, Slavin AJ, Komagata Y, Chen Y, Liu L, Weiner HL. IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1998;28:2780-90.
216. Gonzalez H, Khademi M, Andersson M, Piehl F, Wallstrom E, Borg K et al. Prior poliomyelitis-IvIg treatment reduces proinflammatory cytokine production. *J Neuroimmunol* 2004;150:139-44.
217. Mouzaki A, Theodoropoulou M, Gianakopoulos I, Vlaha V, Kyrtsolis MC, Maniatis A. Expression patterns of Th1 and Th2 cytokine genes in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) at presentation and their modulation by intravenous immunoglobulin G (IVIg) treatment: their role in prognosis. *Blood* 2002;100:1774-9.
218. Crossley AR, Dickinson AM, Proctor SJ, Calvert JE. Effects of interferon-alpha therapy on immune parameters in immune thrombocytopenic purpura. *Autoimmunity* 1996;24:81-100.
219. Paleolog EM, Aluri GR, Feldmann M. Contrasting effects of interferon gamma and interleukin 4 on responses of human vascular endothelial cells to tumour necrosis factor alpha. *Cytokine* 1992;4:470-8.
220. Olcay L, Yenicesu I, Yetgin S. Soluble P-selectin, interleukin 6, and thrombopoietin levels in children with acute and chronic idiopathic thrombocytopenic purpura and their relationship with mega-dose methylprednisolone therapy: a pilot study. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:742-5.
221. Williams N, Bertocello I, Jackson H, Arnold J, Kavnoudias H. The role of interleukin 6 in megakaryocyte formation, megakaryocyte development and platelet production. *Ciba Found Symp* 1992;167:160-70; discussion 170-3.
222. Rennick D, Jackson J, Yang G, Wideman J, Lee F, Hudak S. Interleukin-6 interacts with interleukin-4 and other hematopoietic growth factors to selectively enhance

the growth of megakaryocytic, erythroid, myeloid, and multipotential progenitor cells. *Blood* 1989;73:1828-35.

223. Yang M, Li K. The role of cytokines and transcription factors in megakaryocytopoiesis. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2002;10:580-5.

224. Bruno S, Gunetti M, Gammaitoni L, Dane A, Cavalloni G, Sanavio F et al. In vitro and in vivo megakaryocyte differentiation of fresh and ex-vivo expanded cord blood cells: rapid and transient megakaryocyte reconstitution. *Haematologica* 2003;88:379-87.

225. Williams JL, Pipia GG, Datta NS, Long MW. Thrombopoietin requires additional megakaryocyte-active cytokines for optimal ex vivo expansion of megakaryocyte precursor cells. *Blood* 1998;91:4118-26.

226. Slavin AJ, Maron R, Weiner HL. Mucosal administration of IL-10 enhances oral tolerance in autoimmune encephalomyelitis and diabetes. *Int Immunol* 2001;13:825-33.

227. Panitsas FP, Theodoropoulou M, Kouraklis A, Karakantza M, Theodorou GL, Zoumbos NC et al. Adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is the manifestation of a type-1 polarized immune response. *Blood* 2004;103:2645-7.

228. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine secretion by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815-22.

229. Cooper N, Heddle NM, Haas M, Reid ME, Lesser ML, Fleit HB et al. Intravenous (IV) anti-D and IV immunoglobulin achieve acute platelet increases by different mechanisms: modulation of cytokine and platelet responses to IV anti-D by FcγRIIa and FcγRIIIa polymorphisms. *Br J Haematol* 2004;124:511-8.

230. Crossley AR, Dickinson AM, Proctor SJ, Calvert JE. Effects of interferon-alpha therapy on immune parameters in immune thrombocytopenic purpura. *Autoimmunity* 1996;24:81-100.

231. Lazarus AH, Ellis J, Semple JW, Mody M, Crow AR, Freedman J. Comparison of platelet immunity in patients with SLE and with ITP. *Transfus Sci* 2000;22:19-27.

232. Gajewski TF, Goldwasser E, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. IFN-gamma inhibits the proliferation of murine bone

marrow cells stimulated with IL-3, IL-4, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 1988;141:2635-42.

233. Garcia-Suarez J, Prieto A, Reyes E, Manzano L, Arribalzaga K, Alvarez-Mon M. Abnormal gamma IFN and alpha TNF secretion in purified CD2+ cells from autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP) patients: their implication in the clinical course of the disease. *Am J Hematol* 1995;49:271-6.

234. Lauria F, Mantovani V, Catovsky D, Guarini A, Gobbi M, Gugliotta L et al. T gamma cell deficiency in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Scand J Haematol* 1981;26:156-60.

235. Mylvaganam R, Garcia RO, Ahn YS, Sprinz PG, Kim CI, Harrington WJ. Depressed functional and phenotypic properties of T but not B lymphocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1988;71:1455-60.

236. Garcia-Suarez J, Prieto A, Reyes E, Arribalzaga K, Perez-Machado MA, Lopez-Rubio M et al. Persistent lymphocytosis of natural killer cells in autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP) patients after splenectomy. *Br J Haematol* 1995;89:653-5.

237. Garcia-Suarez J, Prieto A, Reyes E, Manzano L, Merino JL, Alvarez-Mon M. Severe chronic autoimmune thrombocytopenic purpura is associated with an expansion of CD56+ CD3-natural killer cells subset. *Blood* 1993;82:1538-45.

238. Lazarus AH, Joy T, Crow AR. Analysis of transmembrane signalling and T cell defects associated with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Acta Paediatr* 1998;424:21-5.

239. Hedlund-Treutiger I, Wahlstrom J, Elinder G. Role of the T cell receptor in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Acta Paediatr* 1998;424:46-50.

240. Craft J, Fatenejad S. Self antigens and epitope spreading in systemic autoimmunity. *Arthritis Rheum* 1997;40:1374-82.

241. Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y. Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. Role in production of anti-platelet autoantibody. *J Clin Invest* 1998;102:1393-402.

242. Kuwana M, Kaburaki J, Kitasato H, Kato M, Kawai S, Kawakami Y et al. Immunodominant epitopes on glycoprotein IIb-IIIa recognized by autoreactive T cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001;98:130-9.
243. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y. Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J Immunol* 2002;168:3675-82.
244. Garcia-Suarez J, Prieto A, Reyes E, Manzano L, Merino JL, Alvarez-Mon M. The clinical outcome of autoimmune thrombocytopenic purpura patients is related to their T cell immunodeficiency. *Br J Haematol* 1993;84:464-70.
245. Semple JW, Freedman J. Cellular immune mechanisms in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP). *Autoimmunity* 1992;13:311-9.
246. Semple JW, Freedman J. Increased antiplatelet T helper lymphocyte reactivity in patients with autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 1991;78:2619-25.
247. Mylvaganam R, Garcia RO, Ahn YS, Sprinz PG, Kim CI, Harrington WJ. Depressed functional and phenotypic properties of T but not B lymphocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1988;71:1455-60.
248. Hoiden I, Moller G. CD8+ cells are the main producers of IL10 and IFN gamma after superantigen stimulation. *Scand J Immunol* 1996;44:501-5.
249. Jewett A, Bonavida B. Activation of the human immature natural killer cell subset by IL-12 and its regulation by endogenous TNF-alpha and IFN-gamma secretion. *Cell Immunol* 1994;154:273-86.
250. Jewett A, Gan XH, Lebow LT, Bonavida B. Differential secretion of TNF-alpha and IFN-gamma by human peripheral blood-derived NK subsets and association with functional maturation. *J Clin Immunol* 1996;16:46-54.
251. Yamada H, Morikawa M, Furuta I, Kato EH, Shimada S, Iwabuchi K et al. Intravenous immunoglobulin treatment in women with recurrent abortions: increased cytokine levels and reduced Th1/Th2 lymphocyte ratio in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* 2003;49:84-9.
252. Kerr JR, Barah F, Matthey DL, Laing I, Hopkins SJ, Hutchinson IV et al. Circulating tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma are detectable during

acute and convalescent parvovirus B19 infection and are associated with prolonged and chronic fatigue. *J Gen Virol* 2001;82:3011-9.

253. Corcoran A, Doyle S, Waldron D, Nicholson A, Mahon BP. Impaired gamma interferon responses against parvovirus B19 by recently infected children. *J Virol* 2000;74:9903-10.

254. Chu YW, Korb J, Sakamoto KM. Idiopathic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Rev* 2000;21:95-104.

## Popis tablica i slika

Popis tablica	strana
Tablica 1. Podjela autoimmune trombocitopenije prema stadiju bolesti.....	10
Tablica 2. Ispitanici s AITP.....	38
Tablica 3. Normalne koncentracije serumskih citokina.....	40
Tablica 4. Prikaz broja trombocita pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u perifernoj krvi djece i odraslih s AITP i ukupno.....	44
Tablica 5. Učestalost težine trombocitopenije u djece i odraslih.....	45
Tablica 6. Prikaz razlika serumskih kocentracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ u zdrave i djece s AITP pri dijagnozi pri dijagnozi.....	48
Tablica 7. Prikaz razlika serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ u zdravih i odraslih s AITP pri dijagnozi.....	49
Tablica 8. Prikaz razlika serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi .....	52
Tablica 9. Prikaz razlika apsolutnog broja limfocita, postotka cirkulirajućih limfocita T, B, T4, T8 i NK stanica pri dijagnozi u perifernoj krvi djece i odraslih s AITP.....	60
Tablica 10. Prikaz povezanosti apsolutnog broja limfocita, postotka cirkulirajućih limfocita T, B, T4, T8 i NK stanica s brojem trombocita u djece i odraslih s AITP.....	61
Tablica 11. Prikaz serumskih protutijela na CMV, EBV, HHV-6, adenovirus i parvovirus B19 u djece s AITP, odraslih i ukupno pri dijagnozi.....	63
Tablica 12. Prikaz povezanosti serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, 10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ s brojem trombocita u perifernoj krvi u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi.....	68
Tablica 13. Prikaz serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ mjerenih pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u djece s AITP .....	70

Tablica 14. Prikaz serumskih koncentracija IL-1 $\alpha$ , -2, -3, -4, -6, -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ i IFN- $\alpha$ mjenjenih pri dijagnozi, nakon 8 tjedana i nakon 6 mjeseci u odraslih s AITP.....	71
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----



## Popis slika

Slika 1. Zreli megakariocit.....	13
Slika 2. Plan ispitivanja .....	42
Slika 3. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, standardne pogreške (SE) i SD IL-4 u zdrave i djece s AITP pri dijagnozi.....	47
Slika 4. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumске koncentracije, SE i SD IL-2 u zdrave i djece s AITP. pri dijagnozi.....	47
Slika 5. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumске koncentracije, SE i SD TNF- $\alpha$ u zdrave i djece s AITP. pri dijagnozi.....	48
Slika 6. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumске koncentracije, SE i SD IL-1 $\alpha$ u zdravih i odraslih s AITP pri dijagnozi.....	50
Slika 7. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-4 u zdravih i odraslih s AITP pri dijagnozi.....	51
Slika 8. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-10 u zdravih i odraslih s AITP pri dijagnozi.....	51
Slika 9. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-4 u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi.....	53
Slika 10. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-6 u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi.....	53
Slika 11. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IFN- $\gamma$ u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi.....	54
Slika 12. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IFN- $\alpha$ u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi.....	54
Slika 13. Prikaz apsolutnog broja limfocita u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi.....	56
Slika 14. Prikaz postotka cirkulirajućih limfocita T4 u djece i odraslih s AITP pri dijagnozi.....	57
Slika 15. Prikaz negativne povezanosti broja trombocita i apsolutnog broja limfocita u perifernoj krvi u odraslih s AITP pri dijagnozi.....	61
Slika 16. Prikaz postotka bolesnika s AITP sa serološki dokazanom akutnom virusnom infekcijom pri dijagnozi.....	64

Slika 17. Prikaz negativne povezanosti broja trombocita u perifernoj krvi i serumskih koncentracija IL-3 u djece s AITP pri dijagnozi.....	67
Slika 18. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-1 $\alpha$ u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi.....	73
Slika 19. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-2 u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi.....	73
Slika 20. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-3 u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi.....	74
Slika 21. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-4 u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi.....	74
Slika 22. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-6 u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi.....	75
Slika 23. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IL-10 u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi .....	76
Slika 24. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD TNF- $\alpha$ u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi.....	77
Slika 25. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IFN- $\gamma$ u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi.....	77
Slika 26. Prikaz srednje logaritmirane vrijednosti serumskih koncentracija, SE i SD IFN- $\alpha$ u zdrave populacije, bolesnika s kroničnom i akutnom AITP pri dijagnozi.....	78

Ova disertacija ostvarena je u :

1. Kliničkoj bolnici Split
  - 1.1. Klinički odjel za dječju hematologiju, onkologiju, imunologiju i medicinsku genetiku Klinike za dječje bolesti
  - 1.2. Laboratorij za imunogenetiku
  - 1.3. Centralni laboratorij Križine
2. Klinici za infektivne bolesti «Dr. Fran Mihaljević» u Zagrebu
  - Odjel za kliničku mikrobiologiju
  - Odsjek za serologiju

Mentor rada je prof . dr. sc. Boris Labar

Rad ima:

- stranice 131
- slika 26
- tablica 14

## Ž I V O T O P I S

Rođena 1949. u Splitu. Maturirala 1968, diplomirala na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, 1974. Studentski rad: Citogenetske varijacije i njihovo genetsko značenje uz Downov sindrom; nagrada rektora Sveučilišta 1972. (mentor prof. Zergollern). Godine 1974. razmjena studenata kirurgija, Regionalna bolnica Madrid.

Stażist u Imunološkom zavodu u Zagrebu; stručni ispit 1975; u DZ Split 1976; specijalizacija pedijatrije 1977; poslijediplomski studij Klinička pedijatrija, 1980; specijalistički ispit 1981; Klinika za dječje bolesti KB Split 1981; Odsjek za dječju hemato/onkologiju, imunologiju 1983; magistarski rad Medicinski fakultet Zagreb, 1986: Sindrom oštećenja hladnoćom (mentor prof. Štambuk).

Usavršavanje: Zavod za hemofiliju i hemoblastoze Medicinskog fakulteta Zagreb, 1985. (prof. Tiefenbach); Hemato/onkologija Otroške klinike Ljubljana, 1986. (prof. Jereb); Hematološka klinika i Centar za znanstvena istraživanja San Gerardo Monza, 1989-2001. (prof. Masera, prof. Biondi); pohađala više međunarodnih seminara/simpozija iz hemato/onkologije, imunologije, genetike, molekularne biologije.

Predsjednica Pedijatrijske sekcije ZLH Split, 1984-1988; znanstveni asistent 1987; voditelj vježbi/seminara na Medicinskom fakultetu Split, 1987; voditelj Odsjeka za hemato/onkologiju i imunologiju Klinike za dječje bolesti KB Split, 1987.

Osovala: klub roditelja "Sanus" 1991, podružnicu HULL 1998, humanitarnim akcijama omogućila donacije za KB Split. Projekt psihosocijalne zaštite djece sa malignom bolešću 1994. (mentor prof. Spineta). Tim za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica KB Split, 2001.

Asistent za predmet Pedijatrija Medicinskog fakulteta Split, 1994. Naziv primarius stekla 2002. Voditelj Kliničkog odjela za dječju hematologiju, onkologiju, imunologiju i medicinsku genetiku 2003.

Član: Nacionalne skupine za leukemije, limfome i nasljedne koagulopatije, WFH, ISTH, ESID, SIOP, HS. Aktivna na više znanstvenih/stručnih skupova/simpozija u zemlji i inozemstvu. Održala više predavanja na stručnim skupovima i javnim tribinama. Mentor više diplomskih radova. Autor više kongresnih priopćenja i radova objavljenih u domaćim/međunarodnim časopisima (CC, Medline/Index Medicus). Govori, piše engleski i talijanski, služi se francuskim i španjolskim jezikom. Majka jednog sina.