



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Раша Х. Медовић

**Оксидациони стрес и антиоксидациони
статус код деце оболеле од имунске
тромбоцитопеничне пурпуре**

докторска дисертација

Крагујевац, 2023. године



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Raša H. Medović

**Oksidacioni stres i antioksidacioni status
kod dece obolele od imunske
trombocitopenične purpure**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2023. godine



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Raša H. Medović

**Oxidative stress and antioxidant status in
children suffering from immune
thrombocytopenic purpura**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, year 2023.

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Раша Медовић
Датум и место рођења: 11. 11. 1985. године, Крагујевац, Република Србија
Садашње запослење: Педијатар–хематолог, Педијатријска клиника, Универзитетски клинички центар Крагујевац Асистент за ужу научну област Педијатрија на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Оксидациони стрес и антиоксидациони статус код деце оболеле од имунске тромбоцитопеничне пурпуре
Број страница: 82
Број слика: 24 графикана, 16 табела, 4 шеме
Број библиографских података: 124
Установа и место где је рад израђен: Педијатријска клиника, Универзитетски клинички центар Крагујевац и Институт за Физиологију, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): Клиничка и експериментална интерна медицина, подпоручје: хематологија
Ментор: др Зоран Игрутиновић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу и шеф катедре за ужу научну област Педијатрија
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 24.09.2020. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-90/15 од 10.02.2021. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњеност услова кандидата: 1. Проф. др Предраг Ђурђевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник; 2. Проф. др Милош Кузмановић, ванредни професор Медицинског факултета, Универзитета у Београду за ужу научну област Педијатрија, члан; 3. Проф. др Иван Срејовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: 1. Проф. др Предраг Ђурђевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, председник; 2. Проф. др Милош Кузмановић, ванредни професор Медицинског факултета, Универзитета у Београду за ужу научну област Педијатрија, члан; 3. Проф. др Иван Срејовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан.
Датум одбране дисертације:

Identifikaciona stanica doktorske disertacije

Autor
Ime i prezime: Raša Medović
Datum i mesto rođenja: 11. 11. 1985. godine, Kragujevac, Republika Srbija
Sadašnje zaposlenje: Pedijatar – hematolog, Pedijatrijska klinika, Univerzitetski klinički centar Kragujevac; Asistent za užu naučnu oblast Pedijatrija na Fakultetu medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu
Doktorska disertacija
Naslov: Oksidacioni stres i antioksidacioni status kod dece obolele od imunske trombocitopenične purpure
Broj stranica: 82
Broj slika: 24 grafikona, 16 tabela, 4 šeme
Broj bibliografskih podataka: 124
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Pedijatrijska klinika, Univerzitetski klinički centar Kragujevac i Institut za fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Klinička i eksperimentalna interna medicina, podpodručje: hematologija
Mentor: dr Zoran Igrutinović, redovni profesor fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu i šef katedre za užu naučnu oblast Pedijatrija
Ocena i odbrana
Datum prijave teme: 24.09.2020. godine
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske disertacije: IV-03-90/15 od 10.02.2021. godine
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenost uslova kandidata: 1. Prof. dr Predrag Đurđević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Interna medicina, predsednik; 2. Prof. dr Miloš Kuzmanović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Pedijatrija, član; 3. Prof. dr Ivan Srejšević, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, član.
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije: 1. Prof. dr Predrag Đurđević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Interna medicina, predsednik; 2. Prof. dr Miloš Kuzmanović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Pedijatrija, član; 3. Prof. dr Ivan Srejšević, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, član.
Datum odbrane disertacije:

Identification page of doctoral dissertation

Author
Name and surname: Raša Medović
Date and place of birth: 11. 11. 1985., Kragujevac, Republic of Serbia
Current employment: Pediatrician – hematologist, Pediatric clinic, University clinical centre Kragujevac; Teaching assistant for narrower scientific field of Pediatrics, Faculty of Medical science, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Oxidative stress and antioxidant status in children suffering from immune thrombocytopenic purpura
No. of pages: 82
No. of images: 24 charts, 16 tables, 4 schemas
No. of bibliographic data: 124
Institution and place of work: Pediatric clinic, University clinical centre Kragujevac and Institute for Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Clinical and experimental internal medicine, subfield: hematology
Mentor: dr. Zoran Igrutinović, Full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac and head of the department for narrower scientific field of Pediatrics
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 24.09.2020.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation: IV-03-90/15 from 10.02.2021.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: 1. Dr. Predrag Djurdjević, Full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for narrower scientific field of Internal medicine, president; 2. Dr. Miloš Kuzmanović, Assistant profesor at the Faculty of Medicine, University of Belgrade, for narrower scientific field of Pediatrics, member; 3. Dr. Ivan Srejović, Assistant professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for narrower scientific field of Physiology, member.
Commission for evaluation and defense of doctoral: 1. Dr. Predrag Djurdjević, Full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for narrower scientific field of Internal medicine, president; 2. Dr. Miloš Kuzmanović, Assistant profesor at the Faculty of Medicine, University of Belgrade, for narrower scientific field of Pediatrics, member; 3. Dr. Ivan Srejović, Assistant professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for narrower scientific field of Physiology, member.
Date of Dissertation Defense:

ЗАХВАЛНИЦА

Захваљујем се пре свега свом ментору, начелнику, великом човеку, учитељу и мом професионалном родитељу, Проф. др Зорану Игрутиновићу на несебичној помоћи, подршци, мотивацији и саветима у изради докторске дисертације, који нису изостали ни једног тренутка од почетка до краја. Велико хвала свим својим драгим професорима, колегама и сарадницима који су ми помогли да закорачим у свет педијатрије, свакодневно ми помажући у жељи да истрајем и да уживам у том дивном свету.

Велику захвалност дугујем катедри за физиологију, на челу са Проф. др Владимиром Јаковљевићем, на феноменалној сарадњи, без чијег учествовања у лабораторијској обради узорака не би ни било могуће спровести истраживање, а посебно издвајам Проф. др Ивана Срејовића на великој помоћи у објављивању научног рада.

Не могу да не поменем и да се не захвалим свим медицинским сестрама одељења хематоонкологије Клинике за педијатрију и лаборантима из педијатријске лабораторије на несебичној помоћи у узорковању и прикупљању података, а највише лаборанткињи Светлани Недељковић.

На крају, без њих све ово не би имало смисла, због пружене љубави, разумевања и инспирације, због толерисања периода нервозе и пружања огромне подршке и ослоња, велико хвала мојој породици, ћерки Искри, најлепшем ћаку прваку, вољеној супрузи Марији, која ће ускоро донети на свет још једну дивну девојчицу, и мојим родитељима.

Раша Медовић

САЖЕТАК

УВОД: Идиопатска тромбоцитопенична пурпура (ИТП) је аутоимунска тромбоцитопенија недовољно јасне патофизиологије.

Циљ рада је испитивање утицаја редокс равнотеже на ИТП код деце.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ: Спроведена је проспективна студија на 27 деце са новооткривеном ИТП (ндИТП), лечених интравенским имуноглобулинима (ив иг); 22 са перзистентном ИТП, лечених кортикостероидима; 29 са хроничном ИТП (хИТП), суплементирани аскорбинском киселином; 12 здравих и 12 излечених од ИТП (контролне групе). Анализирани су основни анамнестички, лабораторијски и параметри редокс равнотеже.

РЕЗУЛТАТИ: Параметри оксидационог стреса, изузев азот оксида (*NO*), простациклина (*PgI2*) и аргинина (*Arg*) су виши код оболелих него у контролној групи. Највише вредности супероксид радикала (O_2^-), индекса липидне пероксидације (*TBARS*), тромбоксана *A2* (*TxA2*), асиметричног диметил аргинина (*ADMA*) и оксидованог *LDL* (*oxLDL*) забележене су код ндИТП и деце са тежом клиничком сликом, нижим бројем тромбоцита и хиперпродукцијом мегакариоцита, а вредности *NO*, *PgI2* и *Arg* су најниже у овим групама. Редуковани глутатион (*GSH*) и каталаза (*KAT*) су виши у контролној групи него код оболелих, а супероксид дизмутаза (*SOD*) је највиша код ндИТП. Редокс равнотежа се нормализује код излечених.

Вредности O_2^- , *TBARS*, H_2O_2 , *TxA2*, *ADMA* и *oxLDL* значајно падају, док вредности *NO*, *PgI2*, *Arg*, и *SOD*, *KAT* и *GSH* расту након терапије ив иг и у мањој мери након кортикостероида. Рецидив болести доводи до пораста O_2^- , *TBARS*, *oxLDL* и *SOD*, уз смањење *NO*, *Arg* и *KAT*. Суплементација аскорбинском киселином нема утицаја на редокс равнотежу код хИТП.

ЗАКЉУЧАК: Поремећаји редокс равнотеже су дефинитивно укључени у патогенезу свих облика ИТП, са најизраженијим варијацијама код ндИТП и у егзацербацији болести, уз побољшање на стандардну терапију.

КЉУЧНЕ РЕЧИ: идиопатска тромбоцитопенична пурпура, деца, оксидациони стрес, антиоксидациона заштита

SUMMARY

INTRODUCTION: Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is an autoimmune thrombocytopenia of insufficiently clear pathophysiology.

The aim of the work is to examine the influence of redox balance on ITP in children.

MATERIAL AND METHODS: A prospective study was conducted on 27 children with newly diagnosed ITP (ndITP), treated with intravenous immunoglobulins (iv ig); 22 with persistent ITP, treated with corticosteroids; 29 with chronic ITP (hITP), supplemented with ascorbic acid; 12 healthy and 12 cured of ITP (control group). Basic anamnestic, laboratory and redox balance parameters were analyzed.

RESULTS: Oxidative stress parameters, with the exception of nitric oxide (NO), prostacyclin (PgI₂) and arginine (Arg), are higher in patients than in the control group. The highest values of superoxide radical (O₂⁻), lipid peroxidation index (TBARS), thromboxane A₂ (TxA₂), asymmetric dimethyl arginine (ADMA) and oxidized LDL (oxLDL) were recorded in ndITP and children with a more severe clinical picture, lower platelet count and hyperproduction megakaryocytes, and the values of NO, PgI₂ and Arg are the lowest in these groups. Reduced glutathione (GSH) and catalase (KAT) are higher in the control group than in patients, and superoxide dismutase (SOD) is the highest in ndITP. The redox balance is normalized in the cured children.

The values of O₂⁻, TBARS, H₂O₂, TxA₂, ADMA and oxLDL decrease significantly, while the values of NO, PgI₂, Arg, and SOD, KAT and GSH increase after iv ig therapy and to a lesser extent after corticosteroids. The disease relapse leads to an increase in O₂⁻, TBARS, oxLDL and SOD, with a decrease in NO, Arg and KAT. The supplementation with ascorbic acid has no effect on the redox balance in hITP.

CONCLUSION: Disorders of redox balance are definitely involved in the pathogenesis of all forms of ITP, with the most pronounced variations in ndITP and in disease exacerbation, with improvement on standard therapy.

KEY WORDS: idiopathic thrombocytopenic purpura, children, oxidative stress, antioxidant protection

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Анатомија и функција тромбоцита.....	1
1.2. Продукција тромбоцита у костној сржи.....	2
1.3. Тромбоцитопеније.....	3
1.4. Патофизиологија имуних тромбоцитопенија.....	4
1.5. Имуна (идиопатска) тромбоцитопенична пурпура.....	6
1.5.1. Новооткривена (акутна) идиопатска тромбоцитопенична пурпура	6
1.5.2. Хронична идиопатска тромбоцитопенична пурпура	9
1.6. Тест кинетике тромбоцита.....	15
1.7. Повезаност оксидационог стреса / антиоксидационе заштите и ИТП.....	15
1.8. Улога појединих параметара ОС / ADS у патофизиологији ИТП	18
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ РАДА	20
2.1. Циљеви рада	20
2.2. Хипотезе рада.....	20
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА	22
3.1. Врста студије	22
3.2. Популација која се испитује	22
3.3. Узорковање испитаника.....	23
3.3.1. Критеријуми за укључивање испитаника у студију	23
3.3.2. Критеријуми за искључивање испитаника из студије.....	23
3.4. Варијабле које се мере у студији	23
3.5. Снага студије и величина узорка.....	29
3.6. Статистичка обрада података	29
4. РЕЗУЛТАТИ	30
4.1. Клиничке и лабораторијске карактеристике деце оболеле од ИТП.....	30
4.2. Параметри ОС и ADS у различитим групама деце оболеле од ИТП.....	39
4.3. Корелација параметара ОС / ADS са различитим клиничким и лабораторијским параметрима код деце оболеле од ИТП	47
4.4. Корелација параметара ОС / ADS и параметара теста кинетике тромбоцита код деце оболеле од х ИТП	49
5. ДИСКУСИЈА	53
5.1. Основне клиничке карактеристике деце оболеле од ИТП.....	53
5.2. Основне лабораторијске карактеристике деце оболеле од ИТП.....	54
5.3. Примењени терапијски модалитети код деце оболеле од ИТП	56
5.4. Тест кинетике тромбоцита код деце са хроничним обликом ИТП	58
5.5. Корелација оксидационог стреса и антиоксидационе заштите и идиопатске тромбоцитопеничне пурпуре.....	59
5.6. Корелација параметара редокс баланса и основних клиничких и лабораторијских параметара код деце оболеле од ИТП.....	68
5.7. Корелација параметара редокс баланса и параметара теста кинетике тромбоцита код деце оболеле од х ИТП.....	70
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	71
7. ЛИТЕРАТУРА	72
8. СКРАЋЕНИЦЕ	79

1. УВОД

1.1. Анатомија и функција тромбоцита

Тромбоцити представљају најмање ћелије у периферној крви, који су просечног дијаметра 2–4 μm . Ношени крвљу циркулишу у неактивном стању, када су овалног облика и описаних димензија, док при активацији у процесима хемостазе или током инфламационих процеса, мењају свој облик, повећавајући своју површину неколико пута, формирањем цитоплазматских израштаја, који су различите величине и облика. Као и еритроцити, ни тромбоцити немају једро, али за разлику од еритроцита, у својој цитоплазми имају неколико врста гранула. Животни век тромбоцита у људској врсти је од 5 до 10 дана, док се нормалан број тромбоцита у периферној крви креће од $150 \text{ до } 450 \times 10^9/\text{L}$ [1, 2].

Две трећине укупног броја тромбоцита циркулише периферном крвљу, док се једна трећина налази углавном у синусоидима слезине, као и мањим делом у интерстицијуму око ендотелних ћелија костне сржи, где служи као функционална резерва. Трећину свог животног века тромбоцити проведу у слезини и одстрањивање остарелих тромбоцита се такође највећим делом одвија у црвеној пулпи слезине, а у мањем проценту у ретикулоендотелијалном систему јетре, костне сржи и плућа [3]. Тромбоцити се током животног циклуса смањују у величини због свог активног метаболизма и због механичког оштећења при проласку кроз синусоиде слезине, па су зато млађи тромбоцити крупнији и метаболички активнији у односу на старије [4].

Друге, мање битне, споредне улоге тромбоцита, које су посебно биле у фокусу испитивања у последњих пар деценија, су у подстицању диференцирања моноцита у макрофаге у различитим инфламаторним процесима, као и у настанку васкуларног инфламаторног одговора, посебно у процесима атеросклерозе и атеротромбозе [5]. Међутим, насупрот томе, најважније, вишеструке улоге тромбоцита су ипак у процесу хемостазе, где они представљају једну од најбитнијих компоненти примарног хемостатског угрушка, али такође активно учествују и у процесима секундарне хемостазе. Самим тим, поремећаји у броју и/или функцији тромбоцита могу довести или до појаве хеморагијских синдрома или са друге стране, до тромбоемболијских догађаја [3–5].

Кључни аспект тромбоцитне функције јесте њихова способност да циркулишу у неактивном стању унутар васкуларног корита, континуирано надгледајући интегритет унутрашње васкуларне површине. У случају да је детектовано оштећење ендотела долази до ослобађања различитих стимулатора који промптно привлаче тромбоците који бивају одмах активирани [4, 5]. У процесу хемостазе најзначајније су следеће улоге тромбоцита:

- Адхезија, која представља слепљивање тромбоцита у једном слоју на местима где је оштећен ендотел и где различите компоненте субендотелног матрикса бивају изложене крвној струји.

- Агрегација, која представља међусобно слепљивање тромбоцита једних за друге, па се на тај начин прави тромбоцитни чеп (тромб).

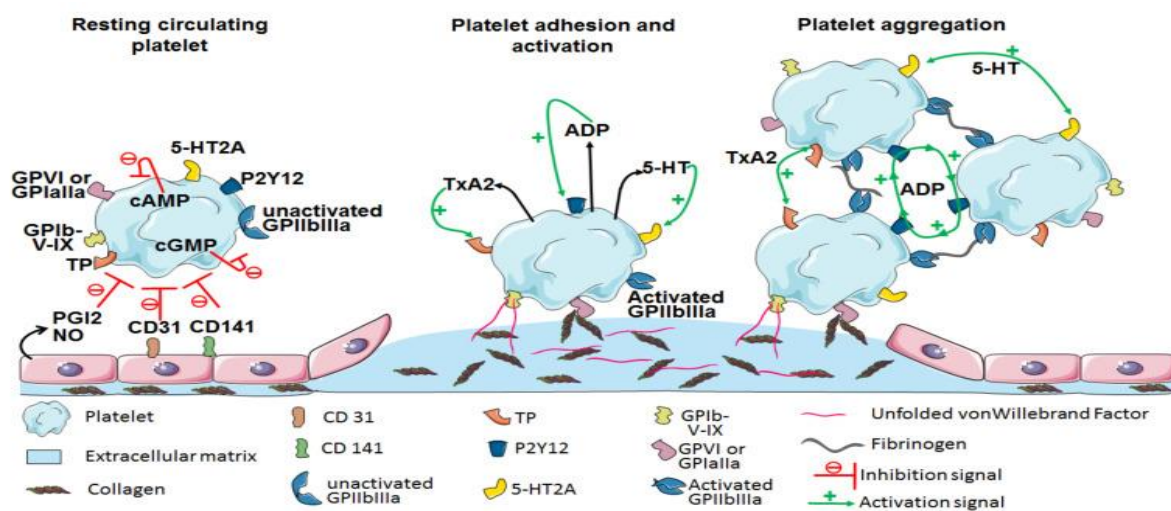
Ове две функције тромбоцити остварују уз помоћ различитих гликопротеина на својој површини. Најпознатији и највише испитани су гликопротеин (*GP*) *Ib/IIIa* који се неселективно везује за различите лиганде – фибриноген, фибронектин, витронектоин, *von Willebrand*-ов фактор, тромбоспондин; док други гликопротеини углавном имају могућност селективног везивања само за једну врсту молекула – *GP Ia/IIa* за колаген, *Ic/IIa* за фибронектин, *Ie/IIa* за ламинин, *GP VI* за колаген и сл.

- Активација тромбоцита и секреција садржаја тромбоцитних гранула.

Након прва два процеса или правилније речено истовремено са њима, због дејства састојака субендотелног матрикса или плазматских солубилних агониста долази

до стимулације и секреције гранула из цитоплазме тромбоцита. Ти се процеси догађају помоћу различитих сигналних молекула. Метаболизам мембранских фосфолипида један је од првих идентификованих и најзначајнијих путева преноса сигнала кроз мембрану тромбоцита, а у склопу њега најзначајнији је метаболизам арахидонске киселине и метаболизам јона калцијума. Резултат активације ова два сигнална пута на тромбоцитима је секреција садржаја тромбоцитних гранула у околну средину. Тромбоцити садрже α , δ и лизозомске λ грануле, које су испуњене разноликим спектром адхезивних протеина, коагулационих фактора, фактора раста, протеазних инхибитора и протеогликана, као и имуноглобулине, затим серотонин, аденинске нуклеотиде, јоне калцијума, магнезијума и катехоламин (Шема 1.).

• Последња улога тромбоцита у процесу хемостазе је мање значајна, а одвија се експресијом тромбоцитног фосфолипида, којим се додатно поспешује процес коагулације [3–7].



Шема 1. Приказ улоге тромбоцита у процесу хемостазе – уз одобрење и љубазност аутора преузето из: Ebermeyer T, Cognasse F, Berthelot P, Mismetti P, Garraud O, Hamzeh-Cognasse H. Platelet Innate Immune Receptors and TLRs: A Double-Edged Sword. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(15): 7894.

1.2. Продукција тромбоцита у костној сржи

Процес стварања тромбоцита у костној сржи се назива мегакариоцитопеза, а одвија се простим распарчавањем цитоплазме зрелих мегакариоцита (Мкц). Поред костне сржи, појединачни мегакариоцитни прекурсори и зрели Мкц могу да доспеју у поједина ткива погодна за њихов развој и диференцијацију попут плућног паренхима или слезине, али је удео ових органа у укупној тромбоцитопоези мали и износи око 10%. Мкц чине веома мали број, само око 0,03–0,06% од свих ћелија у костној сржи. То су крупне ћелије промера од 18 до 160 μm , обично са више једара [8, 9]. У њиховој пролиферацији и диференцијацији учествују пре свих ендотелне ћелије, у оквиру строме костне сржи, али и екстрацелуларни матрикс, посредством бројних ћелијских интеракција, као и истовременом синтезом и секрецијом бројних цитокина и фактора раста, који су неопходни за успешну Мкц-поезу (интерлеукини -1, -3, -6 и -9, гранулоцитно-макрофагни стимулишући фактор раста, стем-ћелијски фактор, еритропоетин, тромбопоетин и други). Ендотелне ћелије и ћелије екстрацелуларног матрикса луче и факторе који инхибишу Мк-поезу: *TGF- β* (*transforming growth factor*), тромбоцитни фактор 4 (ТФ4) и различите интерфероне, које такође ослобађају и сами тромбоцити [10].

За Мкц-поезу је специфична појава једарне ендорепликације (ендомитозе) која представља удвајање ДНК два или више пута, док деоба једра и цитоплазме изостаје, што је јединствен биолошки феномен код људи, за сада уочен и својствен искључиво Мкц. Ако знамо да у једрима свих осталих ћелија постоји ДНК са једним сетом од 23 хромозома, на претходно описани начин настају Мкц са полиплоидним једром, са садржајем ДНК од $4N-128N$ (просечно око $16N$), где N означава тај један сет од 23 хромозома, по чему су Мкц јединствени. Количина цитоплазме код овако насталих Мкц је пропорционална капацитету продукције тромбоцита (броју N сетова хромозома).

Други занимљив феномен који је поново својствен само Мкц је да током завршне фазе сазревања у цитоплазми Мкц започиње процес формирања система демаркационих мембрана, тј. почетног распарчавања цитоплазме. Такви зрели Мкц се налазе на ендотелном крају костне сржи, бивају укотвљен уз синусе костне сржи, па се делови цитоплазме Мкц попут псеудопода провлаче између ендотелних ћелија. Дејством *shear* стреса, откидају се велики сегменти цитоплазме, тзв. протромбоцити, који продиру у крвоток, где се даље распарчавају и постају зрели тромбоцити. Просечно од једног Мкц настане око 8000 тромбоцита [8–11].

Најважнији регулатор Мкц-поезе је тромбопоетин (ТПО) који, негативном повратном спрегом, везујући се за свој рецептор регулише број циркулишућих тромбоцита. Током нормалне хомеостазе, број тромбоцита се одржава у уским границама при чему је ниво циркулишућег ТПО низак. Код тромбоцитопеније, услед смањене масе тромбоцита, смањује се везивање ТПО за рецепторе и последично се смањује његова разградња. Резултат је пораст концентрације ТПО у серуму и појачана стимулација Мкц-поезе. Овакав механизам регулације се назива „ефекат сунђера”. Тромбопоетински рецептор се експримира искључиво на Мкц лози, почев од незрелих матичних ћелија опредељених за Мкц лозу, па све до тромбоцита [11, 12].

1.3. Тромбоцитопеније

Тромбоцитопенија представља стање која карактерише број тромбоцита у периферној крви мањи од $150 \times 10^9/L$, што може бити повезано са већим ризиком од крварења. Настаје као последица:

- смањеног стварања тромбоцита
- поремећене дистрибуције тромбоцита,
- повећане разградње тромбоцита и
- комбинацијом поменутих механизма [13–15].

Смањено стварање тромбоцита у костној сржи процесом Мкц-поезе готово увек доводи до тромбоцитопеније. Постоје наследне (примарне) тромбоцитопеније узроковане смањеним стварањем тромбоцита и то су врло ретки и углавном веома тешки поремећаји, у великом проценту удружени са другим органским (најчешће скелетним) абнормалностима. Стечене (секундарне) тромбоцитопеније узроковане смањеним стварањем тромбоцита су чешћи поремећаји и настају услед дејства чинилаца који спречавају сазревање мегакариоцита (нпр. у хематолошким малигнитетима или дејством токсина) [15, 16].

Тромбоцитопеније настале због поремећене дистрибуције настају доминантно у стањима спленомегалије и последичног хиперспленизма различите етиологије и оне такође спадају у секундарне. 30% од укупне тромбоцитне масе чини функционална резерва у слезини, док се код болесника са хиперспленизмом процењује да се преко 90% тромбоцита налази у слезини [17].

Повећана разградња тромбоцита се дешава код имуних тромбоцитопенија. То је група болести у којима је повећана деструкција тромбоцита изазвана имунолошким

механизмима, при чему је њихова продукција од стране Мкц обично повећана. Међутим, постоје докази да је код малог броја тих болесника, тромбоцитопенија изазвана смањеном продукцијом тромбоцита од стране мегакариоцита у костној сржи, али остаје нејасно да ли је у тим ситуацијама тромбоцитопенија изазвана селективном деструкцијом тромбоцита и Мк или аутоантитела делују на цитокине неопходне за раст и пролиферацију Мкц [18–20].

Међутим, не може се свака тромбоцитопенија измерена аутоматским бројачем доказати и цитолошким (микроскопским) прегледом размаза периферне крви. Најчешћи узрок лажне (псеудо) тромбоцитопеније је аглутинација тромбоцита у тзв. розете, подстакнута ниском температуром или етилен ди аминокетарат (ЕДТА) зависним *IgM* антителима. Процењује се да 1:1000 хоспитализованих болесника због било ког патолошког (хирушког, интернистичког или инфективног) стања, као и 1:100000 здравих појединаца има изванредан степен ЕДТА индуковане тромбоцитне агрегације, па се зато саветује да се свака верификована тромбоцитопенија аутоматским бројачем провери и цитолошким прегледом размаза периферне крви и у оба најчешће коришћена антикоагулантна средства, ЕДТА и натријум цитрату, посебно код пацијената без знакова хеморагијског синдрома [21].

1.4. Патофизиологија имуних тромбоцитопенија

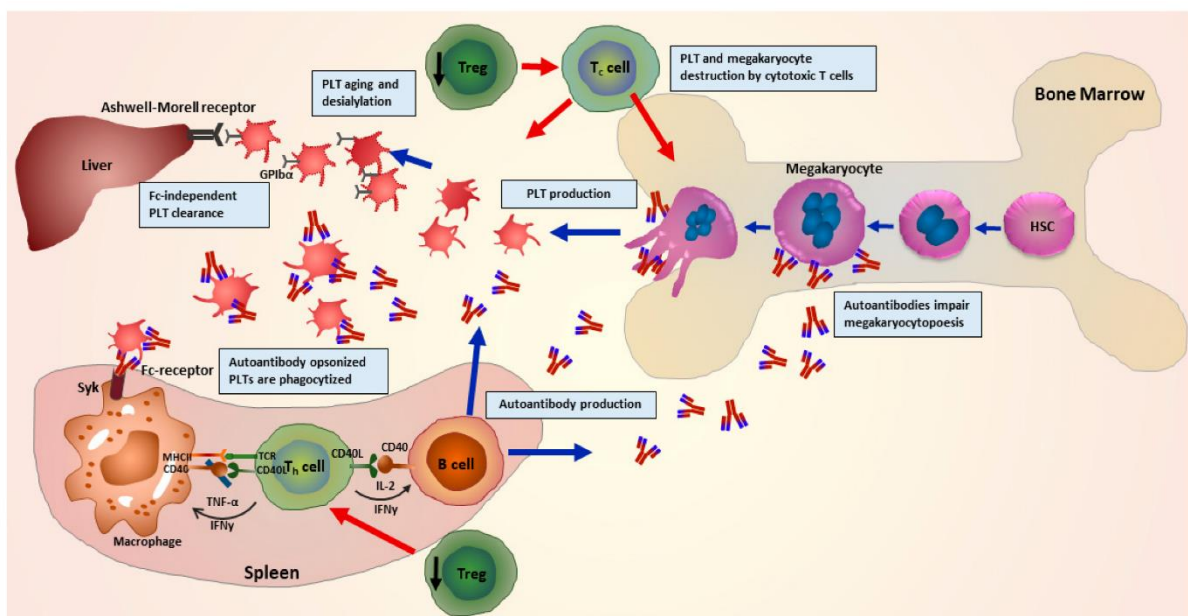
Имуне тромбоцитопеније представљају групу болести у којима су различити имунолошки патофизиолошки механизми одговорни за повећану деструкцију тромбоцита. Аутоимуне тромбоцитопеније одликују се везивањем аутоантитела (најчешће *IgG*, ређе *IgM* класе) за специфичне гликопротеине на тромбоцитима (пре свега *GP-IIb/IIIa* и *GP-Ib/IX* комплекс) [22, 23]. Имуне тромбоцитопеније које настају нпр. у системском лупус еритематоидесу, антифосфолипидном синдрому, болестима везивног ткива или различитим неоплазмама, вероватно се одликују везивањем антитромбоцитних антитела за специфичне гликопротеине или фосфолипиде на мембрани тромбоцита. У пострасфузионој имуној тромбоцитопенији, алоантитела настају због претходне сензибилизације на тромбоцитне антигене током претходних трансфузија или трудноће. Неонатална тромбоцитопенијска пурпура настаје услед деловања алоантитела мајке против тромбоцита фетуса или новорођенчета. Имуне тромбоцитопеније могу бити изазване и антителима створеним на разне лекове, или на бактеријске и вирусне антигене. У тим случајевима, алоантитела настају или на комплекс унетог страног антигена и гликопротеина тромбоцита или на измењен тромбоцитни гликопротеин под дејством страног узрочног антигена (агенса). Овакве тромбоцитопеније су углавном транзиторне јер њихово трајање захтева присуство страног антигена (лек, метаболит, инфективни агенс) у циркулацији [24].

Међутим, ово је класификација према механизму настанка може бити корисна за лакше разумевање различитих форми имуних тромбоцитопенија, али је од мањег значаја за клиничку и терапијску примену. Много чешће је у употреби патофизиолошка класификација, на основу које се имуне тромбоцитопеније деле на примарне и секундарне [25].

Најчешћа примарна аутоимуна тромбоцитопенија или имуна (идиопатска) тромбоцитопенијска пурпура (ИТП) је аутоимуна болест у којој је деструкција тромбоцита примарно изазвана *IgG* аутоантителима против тромбоцитних гликопротеина *GPIIb/IIIa* и *GPIb/IX*. Секундарне имуне тромбоцитопеније удружене су са другим аутоимуним болести као што су системски лупус еритематодес, реуматоидни артритис или склеродермија. Такође, могу настати у хроничној лимфоцитној леукемији, лимфомима, инфламаторним болестима црева, малигнитетима, саркоидози и слично. Механизам тих тромбоцитопенија није довољно проучен, али је вероватно да су

изазване секундарно насталим аутоантителима. Свакако лечењем основне болести поправља се тромбоцитопенија [22–25].

Традиционални патофизиолошки концепт настанка имуних тромбоцитопенија и серолошка испитивања сугеришу да аутоантитела, најчешће *IgG* класе (али не ретко и других подкласа, пре свих *IgM*), највероватније против вирусних антигена, компонената вакцина, токсина инсеката, или у склопу других аутоимуних и инфективних болести, имају повећан афинитет везивања за гликопротеине *Ib/IX* и комплекс *IIb/IIIa* на мембрани тромбоцита. Тако обележени тромбоцити агрегирају и долази до њихове појачане екстраваскуларне деструкције у ћелијама ретикулоендотелијалног система доминантно слезине, али и јетре, или се покреће процес активације компоненти комплемента и последично апоптозе (Шема 2.) [22–26]. Велики део ових механизма је разјашњен у *invitro* студијама и кроз клиничка запажања, уосталом ту се крије и теоријско објашњење зашто спленектомија може довести до излечења код две трећине болесника са ИТП [26].



Шема 2. Приказ патофизиолошког процеса у примарној аутоимуној тромбоцитопенији – уз одобрење и љубазност аутора преузето из: Singh A, Uzun G, Vakchoul T. Primary Immune Thrombocytopenia: Novel Insights into Pathophysiology and Disease Management. J Clin Med. 2021; 10(4): 789.

Међутим, ван ових јасних чињеница и запажања, патофизиологија аутоимуних тромбоцитопенија и даље је релативно нејасна. Врло често литературни подаци нису усклађени и добијени закључци и запажања нису потврђена. Тако, на пример, једна група испитивача је запазила олигклоналност у лимфоцитима болесника са ИТП, међутим, други нису били у стању да потврде олигклоналну природу *B*-лимфоцита који продукују аутоантитела [27]. Сличан поремећај *T*-лимфоцита, код неких болесника са ИТП, указује на могућу улогу дисфункције *T*-лимфоцита у настанку болести, посебно на утицај цитотоксичних *T* лимфоцита пре свега на мегакариоците [28]. Тромбоцити експримирају главни комплекс хистокompatбилности класе I који посредује у ефекторском препознавању *CD8+* *T* ћелија, а потврђено је да *CD8+* *T* ћелије имају повећан цитотоксични потенцијал код особа које пате од ИТП. Код пацијената са ИТП је такође карактеристична неравнотежа између *Th17* и регулаторних *T* ћелија [27, 28].

И остали аспекти имуне тромбоцитопеније остали су неразјашњени. Испитивања су показала да неки болесници са ИТП имају век тромбоцита близу нормале. То указује на могућност да аутоантитела могу оштетити и Мкц или да само неки тромбоцити представљају циљ за антитела, док на друге не делују. Везивањем аутоантитела за Мкц инхибира се њихова матурација или долази до деструкције, тако да тромбопоетин не може да испољи своју улогу [22, 23]. Претпоставља се да ИТП представља спектар болести од којих се већина одликује аутоантителима, директно против тромбоцита и/или Мкц [22–26]. Други спектар вероватно чине болести које изгледају слично као ИТП, са изолованом тромбоцитопенијом, али су у основи изазване другим разлозима, као што је нпр. слаба продукција тромбоцита због релативног или апсолутног недостатка тромбопоетина или других фактора раста одговорних за тромбоцитопоезу [29]. Многе студије последњих година су показале да и абнормалности дендритичних ћелија, *Natural killer (NK)* ћелија, поремећаји цитокина (интерлеукина 2 и 17 и интерферона γ), програмирана ћелијска смрт, инфекција, трудноћа и лекови могу имати значајну улогу у патогенези ИТП [27–29]. Постоји и одређен број студија које показују да је ниво оксидационог стреса повишен код пацијената са ИТП и да корелира са тежином болести и бројем тромбоцита [30].

Нису утврђени механизми који би објаснили како инфекција са *Helicobacter pylori* може утицати на патогенезу ИТП. Постоји корелација између инфекције са *Helicobacter pylori* и терапијског одговора код половине болесника са хроничном ИТП, али код тешке дуготрајне хроничне ИТП ерадикациона терапија за *Helicobacter pylori* је мање ефикасна у побољшању тромбоцитопеније [31].

1.5. Имуна (идиопатска) тромбоцитопенична пурпура

Имуна (идиопатска) тромбоцитопенијска пурпура (ИТП) је аутоимуна болест у којој деструкција тромбоцита настаје под дејством примарних антитромбоцитних антитела против тромбоцитних гликопротеина *GPIIb/IIIa* и *GPIb/IX*. По току може бити акутна или хронична. Најновија класификација дели ИТП на новооткривену форму, која траје до 3 месеца, перзистентну форму од 3 до 12 месеци и хроничну форму, када болест траје дуже од 12 месеци [25].

1.5.1. Новооткривена (акутна) идиопатска тромбоцитопенична пурпура

Годишња инциденца акутне ИТП у Сједињеним америчким државама је 7,5 на 100000 деце и 3,7 на 100000 одраслих, нешто се чешће јавља код особа женског пола и најчешће се јавља код деце и старијих од 65 година, али је инциденца у старијој групи дискутабилна због честе појаве секундарне непрепознате тромбоцитопеније. Трошкови лечења за првих 12 месеци трајања болести се процењују на око 20000\$ по пацијенту. Највећи број хоспитализација се дешава у прва три месеца болести и два пута се чешће хоспитализују деца него одрасли [32].

Акутна ИТП је болест која се обично јавља у дечијем узрасту, најчешће након прележане вирусне инфекције, обично горњег дела респираторног тракта, или након вакцинације (највише података говоре у прилог ММР вакцини), а има података и да уједи инсеката или токсини могу започети имунолошки процес [33, 34]. Клиничке манифестације ИТП су изузетно варијабилне, од асимптоматских облика до витално угрожавајућих крварења. Око 20% пацијената са новооткривеном ИТП су асимптоматски, а болест се открива током рутинске контроле крвне слике након прележане вирусне инфекције. Обично болест почиње нагло, углавном крварењем по кожи (хематоми, петехије и екхимозе) и видљивим слузокожама (најчешће епистакса или из десни), гастроинтестиналног (мелена или хематемеза) или урогениталног тракта (обично менометрорагија). Крварење се обично јавља у току друге недеље после

инфекције и траје неколико дана, а највише до две недеље. Осим склоности хеморагијском синдрому, остали клинички налаз у највећем броју сличајева је углавном уредан, па свако постојање лимфаденопатије или органомегалије није у складу са дијагнозом. Најозбиљнија компликација је интракранијално крварење, срећом са малом инциденцијом <1% [25, 35, 36].

Дијагноза новооткривене ИТП (Шема 3.) поставља се на основу типичне анамнезе о наглom настанку хеморагијског синдрома и постојању тромбоцитопеније у крвној слици (обично $<20 \times 10^9/L$), често са присутним мегатромбоцитима у цитолошком прегледу размаза периферне крви. Скрининг хемостазе треба увек урадити у сврху искључења неког од поремећаја коагулације. Време крварења је продужено у највећем броју случајева, док остали тестови углавном нису поремећени [25, 33, 35–38]. Потребно је извршити испитивање хормонског статуса штитасте жлезде, јер је по литературним подацима аутоимуни поремећај функције штитасте жлезде најчешћа придружена манифестација. Такође, код одређеног броја деце буду позитивна антинуклеусна (ANA) или лупус антикоагуланс антитела (LAC), али њихов значај није прецизно установљен. Досадашњим испитивањем није утврђен њихов ефекат на трајање ремисије или прелазак у хронични облик болести [37].

Вредности имуноглобулина су у највећем проценту у референтним границама за узраст, али се дешава и да вредности IgG буду и лако повишене [22, 23]. Такође, потребно је урадити антигенски тест из столице на *Helicobacter pylori*, па у случају позитивног теста или постојања субјективних дигастричних тегоба урадити езофагогастродуоденоскопију са узимањем биопсије и брзи уреазе тест, уз консултацију гастроентеролога и ординирање ерадикационе терапије, која по литературним подацима, у високом проценту (20–30%) може довести и до повлачења ИТП. Нема конзистентних података да ли су то пацијенти код којих би у сваком случају дошло до ремисије или је ерадикациона терапија и елиминација узрочника довела до исте и још увек се не зна тачна патофизиолошка повезаност ова два ентитета [25, 31, 37].

Цитолошки преглед аспирата костне сржи је ретко потребан за новодијагностиковану форму, али уколико се ипак уради мијелограм, обично се уочава повећан или ређе нормалан број мегакариоцита, уз уредну целуларност прекурсора црвене и беле лозе. Аспирацију костне сржи треба урадити код пацијената која имају неадекватан одговор на терапију интравенским имуноглобулинима, посебно пре увођења терапије кортикостероидима, с обзиром да тромбоцитопенија може бити једини лабораторијски параметар у почетку акутних леукемија у дечијем узрасту, а терапија *Prednizon*-ом може довести до тренутне ремисије или до промене фенотипа леукемијског клона. Ултрасонографски преглед абдомена потребно је обавезно урадити у циљу искључења органомегалије [25, 35, 37]. Последњих година је у сфери интересовања и повезаност хиповитаминозе Д са ИТП, где је установљена конекција између ова два ентитета, у неким серијама до 80%, али постоје и докази да не доприноси болести само снижен ниво витамина Д, већ пре свега полиморфизам гена за рецептор витамина Д, мада тек треба спровести опсежнија истраживања на ову тему [39, 40].

Шема 3. Дијагностички протокол код новодијагностиковане ИТП

Лабораторијске анализе:

- ККС, цитолошки преглед размаза периферне крви
- скрининг хемостазе (*PT, aPTT, INR*, фибриноген)
- хормонски статус штитасте жлезде (*FT4, TSH, antiTPO* и *antiTG* антитела)
- Ниво витамина Д
- Основне биохемијске анализе и седимент урина

Серолошке анализе:

- Ниво имуноглобулина у серуму (*IgA, IgG, IgM*)
- Аутоантитела: *ANA, LAC, Coombs* тест...
- Антиген на *Helicobacter pylori* у столицама

Додатна

- #### дијагностика:
- Ехосонографски преглед абдомена
 - *ОРЛ преглед
 - *РТГ плућа и срца

Неадекватан терапијски одговор на ив имуноглобулине; потреба за системским кортикостероидима; перзистентни / хронични облик болести:

- цитолошки преглед аспирата костне сржи

*биопсија костне сржи (по потреби)

*цитогенетска и флоуцитометријска испитивања (по потреби)

-тест кинетике тромбоцита

Акутна ИТП углавном је бенигно обољење и обично пролази спонтано без икаквих последица. 20% пацијената је асимптоматско при презентацији болести. Код 60% деце са ИТП клиничке манифестације могу спонтано нестати у року од 3 месеца, а код додатних 20–30% у року од годину дана, када се тумаче у контексту перзистентне форме и захтевају озбиљније праћење. На клиничарима је одлука, уз обавезну консултацију и детаљно објашњење родитељима, у складу са тежином хеморагијског синдрома, како ће се спроводити лечење. Обично степен хеморагијског синдрома корелира са бројем тромбоцита, али релативно ретко се дешава да деца са бројем тромбоцита између $20\text{--}50 \times 10^9/\text{L}$ више крваре него деца са нижим бројем тромбоцита. Међутим, овај феномен је по подацима из литературе више изражен код деце са хроничном ИТП [25, 35, 37].

Неколико истраживача је покушало да направи скалу за процену крварења код ИТП – *Bleeding severity score (BSS)*, који представља субјективну процену степена крварења од стране лекара. Раније је презентована скала са оценама од 0 до 4 на 4 различита места (усна дупља, епистакса, кожа и остала крварења (интраабдоминална, хематурија, метрорагија, интракранијална), током последња 24 часа, где асимптоматски пацијенти добијају оцену 0, са благим знацима хеморагијског синдрома оцене од 1 до 4, са средње израженим знацима оцене од 5 до 8 и са израженим знацима оцене од 9 до 16, али се и даље лечење ипак заснива на индивидуалној процени клиничара [41]. Новији покушаји прављења оваквих скала групишу крварење код пацијента у три главна домена: кожа, видљиве слузокоже и органи, са степеном тежине који поново процењује ординирајући лекар. Озбиљност крварења се оцењује од 0 до 3 (или по неким скалама 4), а оцена 5 се даје за свако фатално крварење (интраабдоминално, интракранијално и слично) [42]. Међутим, до данас је степен крварења код ИТП-а остављен на процену сваком појединачном клиничару хематологу, који руководи ординирањем терапије.

Тренутно владају ставови да при ниском броју тромбоцита (<20 или $10 \times 10^9/\text{L}$) и манифестном крварењу лечење се спроводи применом великих доза интравенских (ив) имуноглобулина ($0,4 \text{ g/kg}$ 3–5 дана или $0,8\text{--}1 \text{ g/kg}$ 1–2 дана) или *Prednison*-ом $1\text{--}2 \text{ mg/kg}$. Код пацијената са тешком тромбоцитопенијом и по живот опасним крварењем велике дозе i.v. имуноглобулина, уз велике дозе *Metilprednizolon*-а ($1\text{--}3 \text{ mg/kg}$) првих неколико дана (1–3 дана), уз наставак терапије *Prednison*-ом и уз трансфузију тромбоцита

(евентуално и деплазматисаних еритроцита зависно од степена крварења) представља врло ефикасну терапију. Иначе, трансфузије тромбоцита треба примењивати само у случају озбиљнијих крварења, обзиром да примењени тромбоцити имају исту судбину као и тромбоцити домаћина, а са друге стране могу чак деловати контрапродуктивно због додатне стимулације имуног система на продукцију аутоантитела.

Анти-РхД антитела у дози од 50–75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ се такође могу користити само код Рх позитивних пацијената, јер блокирају ретикулоендотелијални систем у слезини, али због неизбежне хемоллизе еритроцита и потенцијалних нежељених ефеката, а недовољне ефикасности, се све ређе користе. Раније је било покушаја лечења високим дозама Витамина Ц од 1–4 g дневно, али су резултати остали контрадикторни. Као супортивна терапија код крварења могу се применити антифибринолитици (аминокапронска киселина и транексамична киселина), који су контраиндиковани код хематурије. Поједини истраживачи су примењивали и методу опсервације код пацијената са блажим знацима хеморагијског синдрома и било којим бројем тромбоцита, чак и испод $20 \times 10^9/\text{L}$, али поред свакако дужег времена за постизање ремисије као лоше стране, није имало никаквог ефекта у смислу дужег трајања постигнуте ремисији или појаве хроничног облика болести у односу на лечену групу деце [25, 33, 37, 38, 43].

1.5.2. Хронична идиопатска тромбоцитопенична пурпура

До сада није могуће предвидети дужину трајања постигнуте ремисије (било клиничке, било лабораторијске), како код новооткривених, тако и код хроничних облика. Око 10–30% деце са акутном ИТП тромбоцитопенија је присутна дуже од 12 месеци и тада настаје хронична ИТП и до сада није могуће дефинисати факторе који на презентацији могу предвидети који ће пацијенти развити хронични облик болести. Исто тако није могуће предвидети којих 20% деце са хроничном ИТП ће имати спонтани опоравак. Званични подаци у литератури говоре да је прелазак болести у хронични облик чешћи код жена и женске деце старије од 10 година, али друге студије ипак потврђују да пол и узраст вероватно немају већег утицаја, посебно у дечијој популацији. Такође, пацијенти који током акутне фазе имају број тромбоцита већи од $20 \times 10^9/\text{L}$ и немају података о претходно прележаној инфекцији или другом узрочном фактору који се може повезати са појавом тромбоцитопеније, су склона појави хроничног облика, али се ни то није потврдило као правило [44–46].

У случају да болест прелази у перзистентну форму, да постоји неадекватан одговор на ив имуноглобулине и *Prednison*, који се не може дуготрајно употребљавати због познатих нежељених ефеката, добар терапијски учинак се може постићи применом пулсних доза *Deksametazon*-а ($28\text{--}40 \text{ mg}/\text{m}^2$ /дневно током 4 дана сваке 4 недеље укупно 4–6 циклуса, ако се примењује орално, или $20 \text{ mg}/\text{m}^2$ /дневно током 4 дана сваких 15 дана укупно 4 циклуса, ако се примењује интравенски). За сада нема јасних доказа који пут администрације и доза *Deksametazon*-а су учинковитији. Постоје и студије које су показале добре терапијске резултате код педијатријске новооткривене ИТП високим дозама *Deksametazon*-а као првим терапијским избором [47, 48].

Раније прихваћена парадигма је била да је за разлику од дечијег узраста, где се хронична ИТП сматра веома ретким стањем, у адултној популацији је честа аутоимуна болест и најчешћа имуна цитопенија која захтева лечење [49]. Још једна погрешна премиса је била да деца са ИТП имају много веће шансе да постигну спонтану ремисију него одрасли са ИТП, што је најновијим студијама оповргнуто. Показано је да се хронична ИТП јавља са скоро подједнаком учесталошћу у обе популације, са том разликом што су код одраслих доминантно погођене жене од 20 до 50 година, које су

углавном до тада биле здраве (Ж:М 2:1), док је та разлика у дечијој популацији мање изражена (Ж:М 1,3:1).

Код деце хронична ИТП најчешће настаје као наставак акутног и перзистентног облика, који је био или клинички или лабораторијски манифестан. Код одраслих често има подмукао почетак, траје дуже времена, са благим симптомима и погоршава се после вирусних инфекција, узимања Ацетил салицилне киселине, нестероидних антиреуматика или алкохола. Највећи број одраслих болесника је асимптоматски, а смањење броја тромбоцита дијагностикује се у току рутинских лабораторијских прегледа, у преоперативној припреми и слично [50, 51]. Деца за разлику од одраслих имају озбиљније знаке хеморагијског синдрома, док се код одраслих региструје већи број коморбидитета [49–51]. Поред хеморагијског синдрома у хроничној ИТП како деце тако и код одраслих, по правилу изостају друге кожне и зглобне промене, лимфаденопатија и органомегалија. Најозбиљнија компликација хроничне ИТП је интракранијално крварење, које се чешће јавља код старијих од 60 година и може угрозити живот болесника, а веома је ретка у дечијој доби [49–51].

Код хроничне ИТП треба искључити све друге облике тромбоцитопенија. Неопходно је урадити аспирациону пункцију или биопсију костне сржи, а не ретко и цитогенетска и флоуцитометријска испитивања, да би се искључила лимфо или мијелопролиферативна обољења. Осим тромбоцитопеније и крварења, као клиничке манифестације хроничне ИТП, сваки други клинички или лабораторијски налаз искључује дијагнозу ИТП. Код деце је потребно орјентационо једном у 6 месеци (зависно од степена крварења) извршити евалуацију болести у смислу провере присуства аутоантитела, хормонски статус штитасте жлезде, ехосонографски преглед абдомена, присуство *Helicobacter pylori* инфекције и друго. Код крварећих пацијената, чест пропратни феномен је сидеропенијска анемија, па често треба спроводити суплементацију гвожђем [50–53].

Болесници са хроничном ИТП и анамнезом о хеморагијском синдрому треба лечити, посебно оне са бројем тромбоцита $<10\text{--}20 \times 10^9/\text{L}$ или са умереном тромбоцитопенијом ($20\text{--}30 \times 10^9/\text{L}$). Асимптоматски ИТП са умереном тромбоцитопенијом ($20\text{--}50 \times 10^9/\text{L}$) или пацијенти са већим бројем тромбоцита од $50 \times 10^9/\text{L}$ углавном не захтевају лечење. Ти болесници могу обилније крварити у току хируршких интервенција или повреда, у току инфекција или после узимања нестероидних антиреуматика и лечење се спроводи само пред хемостатске изазове. Међутим, између тих епизода број тромбоцита се обично враћа на уобичајене вредности. Сматра се да овакви болесници имају доследан модел кретања броја тромбоцита када се прате више година [52–55]. Због оваквог обрасца испољавања болести, посебно је тешко правити скалу за процену крварења, па је постигнут консензус да се овакве процене врше само при релапсима болести, за сваки релапс посебно [41, 42].

Лечење хроничне идиопатске тромбоцитопеничне пурпуре није униформно и стандардизовано и треба бити прилагођено сваком појединачном пацијенту. Постоји више терапијских опција који су у оптицају и подељене су на три терапијске линије (Табела 1.).

Табела 1. Лечење хроничне идиопатске тромбоцитопеничне пурпуре				
Терапија прве линије				
Назив лека	Дозирање	Дужина примене	Успех терапије (ремисија)	Нежељена дејства
ив имуноглобулини	Укупна доза 2 g/kg ТМ	1-5 дана	70-90% (од неколико дана до више месеци или година)	Главобоља, мијалгија, наузеза, температура
<i>Prednizon</i>	- Пулсне дозе 20-30 mg/m ² или 1-2 mg/kg ТМ; - 5-20 mg/дан	- 3-5 дана; - 4-8 недеља, са смањењем дозе; - супортивна терапија	30-70% (контрадикторни подаци)	Повећање телесне масе, кушингоидни изглед, акне, ризик од инфекције, остеопороза, улкус
<i>Deksametazon</i>	28-40 mg/m ² /дан пер ос; 20 mg/m ² /дан ив	Током 4 дана сваке 4 недеље 4-6 циклуса	70-80% (од неколико дана до више месеци или година)	Исто као <i>Prednizon</i>
Терапија друге линије				
Спленектомија			75-90% (углавном трајна ремисија)	спленична и портна венска тромбоза, плеурални излив, интраабдоминалне фистуле, тромбоцитоза, ризик од инфекција
Агонисти рецептора за тромбопоетин	<i>Romiplostim</i> : 1 µg/kg/дан, ↑ за 1 µg/kg недељно до макс. од 10 µg/kg. <i>Eltrombopag</i> 50 mg/дан (>6 год); 25 mg/дан (1-6 год), ↑ по 12,5 mg на две недеље до макс 75 mg/дан	Дуготрајно, годинама; Прекида се на број тромбоцита од 250×10 ⁹ /L или ако нема терапијског одговора након 3-6 месеци.	50-85%; Чешће клиничка, ређе лабораторијска ремисија	главобоља, повраћање, хепатична дисфункција, мијелодисплазија или фиброзе костне сржи?
Терапија треће линије				
<i>Rituximab</i>	375 mg/m ²	1x недељно 4 циклуса	35-65%; неконзистентни подаци	Алергијске реакције; секундарна хуморална имунодефицијенција; инфекције, цитопеније, бронхоспазам, кардио и неуролошки поремећаји
<i>Mycophenolate Mofetil</i>	600 mg/m ² /дан у две дозе	Дуготрајно; прекида се након 1-2 месеца ако нема одговора	20-60%; неконзистентни подаци	Дијареја, леукопенија, сепса, наузеза, склоност малигнитетима
<i>Azathioprine</i> ; <i>Cyclophosphamide</i> ; <i>Vinblastine/Vincristin</i> ; <i>Kolhicin</i> ; <i>Hydroxychloroquine</i> ; <i>Cyclosporin A</i> ; <i>Dapsone</i> ;	1-3 mg/kg/дан; 5-20 mg/kg/дан; 1,5-2 mg/m ² /нед; 0,5-1 mg/дневно; 5 mg/kg/дан; 5-7 mg/kg/дан; 1-2 mg/kg/дан;	Дуготрајно, различите дозе и комбинације лекова; прекида се након 1-2 месеца ако нема одговора	20-80%; неконзистентни подаци	Општа нежељена дејства, дисфункција јетре, малигнитети; супресија костне сржи
<i>Fostatinib</i>	100-300 mg/дневно	Током 4 месеца и прекида се ако нема одговора	У току су клиничка испитивања	У току су клиничка испитивања

а.) *Prednizon* је дуго година представљао главни лек за лечење хроничне ИТП у дози 1–2 mg/kg дневно, посебно код одраслих пацијената, сам или у комбинацији са лековима из друге или треће линије. Не треба га примењивати у великој дози дуже од 4 недеље, ако болесник не реагује, јер то повећава ризик од нежељених дејстава (повећање телесне тежине, кушингоидни изглед, акне, повећан ризик од инфекције, остеопороза). Међутим, комплетна ремисија под кортикостероидима је ретка. Код деце се са терапијом *Prednizon*-ом у највећем проценту већ покушало током првих 12 месеци трајања болести, са различитим успехом, па се у хроничном облику обично користи само као супортивна терапија у малим дозама током увођења неке од терапије друге линије [25, 38, 52–55].

б.) Ретикулоендотелијална блокада се постиже великим интравенским дозама имуноглобулина или анти-РхД имуноглобулином, код Рх позитивних болесника. Оба лека делују на исти начин компетитивном блокадом фагоцитних ћелија, пре свега у слезини. Индикација за примену постоји када је број тромбоцита мањи од $20 \times 10^9/L$, или испод $50 \times 10^9/L$, ако постоји озбиљно крварење. Уобичајена доза i.v. имуноглобулина је 1 g/kg у току 6–8 сати. Доза се обично понавља следећег дана или после неколико дана код болесника који нису реаговали. Раније се давао 0,4 g/kg у току 5 дана, међутим, то није дало боље резултате. Већина лекара користи укупну дозу од 2 g/kg. Главни недостатак лечења је висока цена, мада је то крвни производ који је изузетно безбедан. У току лечења релативно ретко се јављају нежељена дејства као што су: главобоља, бол у леђима, наузеја, температура. Анти-РхД имуноглобулин може изазвати ретикулоендотелну блокаду само код Рх позитивних болесника. Анти-РхД у појединачној дози од 50–75 $\mu g/kg$ је изгледа мање ефикасан од интравенских имуноглобулина, али даје бржи терапијски одговор (у току неколико минута до неколико сати) и лечење је јефтиније, али су резултати још увек контрадикторни. Анти-РхД изазива хемолизну анемију код лечених болесника, која је често асимптоматска, међутим, ако хемолиза напредује, његова даља употреба је ограничена. Међутим, запажено је да и за ив имуноглобулине и анти-РхД ако се дају у више наврата, постепено долази до стварања толеранције и смањења терапијског одговора, што је опет озбиљан проблем код крварећих пацијената [25, 38, 43, 52–55].

в.) Слезина је просечно код 2/3 хроничних ИТП пацијената главно место где се одвија деструкција тромбоцита, а теоријски спленектомијом се уклања и место продукције тромбоцитних аутоантитела, па већина пацијената реагује на спленектомију повећањем броја тромбоцита до безбедног нивоа. За сада нема поузданих преоперативних прогностичних параметара. Нека клиничка запажања указују да добар терапијски одговор на ив имуноглобулине корелира са добрим одговором на спленектомију, док са друге стране, повољно преоперативно реаговање на стероиде даје контрадикторне резултате [26]. На основу резултата велике студије од преко 400 спленектомисаних болесника са хроничном ИТП, доказана је ефикасност код 96% болесника млађих од 30 година и код 91% старијих од 30 година, али код којих је место деструкције тромбоцита било само у слезини, док је спленектомија била ефикасна код свега 8% ако се деструкција тромбоцита одвијала у јетри или мешовито [56]. Спленектомија у ИТП је индикована ако тромбоцитопенија не реагује на претходно примењену терапију, ако постоје чести рецидиви и потреба за трансфузијама, мада у дечијој доби, у многome зависи и од става родитеља према болести. Генерално, спленектомија је непотребна ако су тромбоцити $>50 \times 10^9/L$ или са било којим бројем тромбоцита, ако болесник не крвари. Преоперативана припрема за спленектомију спроводи се i.v. имуноглобулинима, ако су тромбоцити $<20 \times 10^9/L$ или/и трансфузијама тромбоцита, ако су $<10 \times 10^9/L$. Повољним знаком за ремисију сматра се повећање броја

тромбоцита првог постоперативног дана изнад $150 \times 10^9/L$ или другог преко $500 \times 10^9/L$ [26, 56, 57].

Морбидитет након спленектомије је око 4%, а морталитет свега 1–1,5% и то углавном код старијих особа. Нежељена постоперативна дејства су ретка, попут спленичне и портне венске тромбозе, плеуралног излива, фистуле црева или желуца. Постспленектомична тромбоцитоза може довести до тромбоемболијских компликација, а настаје зато што у циркулацију улазе и они тромбоцити који представљају резерву. Ово није ретка компликација, па је неопходно пратити број тромбоцита у постоперативним данима, чак до 2-3 недеље, јер се тада обично постепено изгуби. До вредности $1000 \times 10^9/L$ треба давати антиагрегациону терапију (100 mg Ацетил салицилне киселине дневно), а преко тог броја и ниско молекуларни хепарин у профилактичким дозама. Ризик од постспленектомичне инфекције (сепсе) изазване пнеумококом, хемофилусом инфлуенце или менингококом је највећи у дечјем добу и у току прве 2–3 године од спленектомије. За превенцију потребно је две недеље пре операције извршити вакцинацију поливалентном антипнеумококном, хемофилус инфлуенца Б и полисахаридном квадريفалентном менингококном вакцином, а у случају ургентне спленектомије непосредно после операције. Уколико се не примени профилактичка вакцинација треба у постоперативном току применити антибиотике (пеницилин или амоксицилин), мада велика већина аутора сматра профилаксу антибиотика неопходном у дужем постоперативном периоду, али је дужина примене антибиотика још увек контраверзна (највише препорука је око годину дана). Поједини аутори разматрају и питање ревакцинације, што је такође остављено сваком појединачном хематологу на процену (већина понавља на 5–10 година) [29, 56–58]. Аксесорне слезине се интраоперативно могу наћи код 15% болесника, а код оних који нису реаговали на спленектомију, доказана је код још 12% пацијената [58].

г.) У последње 2 деценије су све чешће у клиничкој употреби лекови који делују као агонисти рецептора за тромбопоетин. Ови лекови се користе за лечење ИТП на тај начин што стимулишу продукцију тромбоцита на нивоу мегакариоцита, уместо досадашњих лекова који су углавном деловали на смањивање деструкције тромбоцита [63, 64]. *Romiplostim* је стимулаторни тромбопоетински пептид који се примењује у облику субкутаних ињекција. Клиничке студије од 2003. године су показале да је *Romiplostim* ефикасан у лечењу хроничне ИТП, када је примењиван у постспленектомичким релапсима, али су након тога урађене бројне студије и код неспленектомисаних пацијената са хроничном ИТП, као и код новооткривених ИТП. Почетна доза је $1 \mu g/kg$ и повећава се за $1 \mu g/kg$ недељно до максималне дозе од $10 \mu g/kg$. Циљ је да се установи најмања доза која ће омогућити одржавање броја тромбоцита $>50 \times 10^9/L$. Ако нема одговора при дози од $10 \mu g/kg$ током 4 недеље терапија се прекида. Са друге стране тромбоцитозу треба избегавати [65]. *Eltrombopag* је орални препарат са сличним ефектом као *Romiplostim*. Почетна доза је 50 mg дневно за пацијенте старије од 6 година или 25 mg дневно за децу од 1 до 6 година. *Eltrombopag* треба дозирати за по 12,5 mg на две недеље да би се одржавао број тромбоцита између 50 и $200 \times 10^9/L$. Максимална доза елтромбопага је 75 mg дневно. Терапија се прекида при броју тромбоцита преко $250 \times 10^9/L$ и ако нема терапијског одговора након 3–6 месеци лечења. За оба лека прелиминарни резултати лечења су врло охрабрујући, како за новооткривене случајеве, тако и за хроничне ИТП, са ремисијом до 85% случајева у појединим серијама [66, 67]. Међутим, ови лекови и поред тога што дају ретка уобичајна нежељена дејства током примена, још увек не знамо са сигурношћу њихов дугорочни утицај на појаву мијелодисплазије или фиброзе костне сржи [63–67].

д.) Око четвртине болесника са хроничном ИТП не реагује на спленектомију, а често они не реагују ни на стандардну иницијалну терапију прве линије, врло често ни на агонисте тромбопоетинских рецептора. Лечење тих болесника је изузетно тешко. Примењују се бројни лекови, појединачно или у различитим комбинацијама (најчешће *Cyclophosphamide*, *Vincristine* и *Prednizon*) и у различитим дозама. Најчешће су коришћене мале или интермитентне дозе кортикостероида, цитотоксични имуносупресиви, као што су *Azathioprine (Imuran)*, *Cyclophosphamide (Endoxan)*, Винка алкалоиди (*Vinblastine* или *Vincristine*), затим *Kolhicin*, *Hydroxychloroquine*, *Cyclosporin A*, *Interferon alpha*, *Dapsone*, *Danazol* и други. Сви ови лекови се примењују експериментално, за већину није јасан тачан механизам деловања на ИТП, морају дуго да се примењују, месецима, па и годинама, са још увек контрадикторним резултатима о ефикасности (од 10 до 80% у различитим серијама) и обично их прате бројна уобичајна нежељена дејства, али чак и озбиљна, попут дисфункције јетре, појаве малигнитета или супресије костне сржи. Такође, покушано је у неким студијама и са плазмаферезом, поново са контрадикторним резултатима [25, 37, 38, 52–55]. Свакако, на одлуку о ординирању терапије друге и треће линије треба да утиче пре свега квалитет живота пацијената, тј. степен крварења [59].

С` обзиром да се дисфункција *T* и *B* лимфоцита сматра једном од основних патофизиолошких механизма настанка ИТП, у последњих неколико година више серија истраживања је рађено са имуномодулаторном терапијом, попут *Mycophenolate Mofetil* и *Sirolimus* у различитим дозама и са различитом дужином примене лекова, појединачно или у комбинацији са малим интермитентним дозама *Prednizon*-а. Резултати свих студија су врло охрабрујући, посебно за *Mycophenolate Mofetil*, са дуготрајном ремисијом (углавном парцијалном) код око 60–70% резистентних хроничних ИТП [60, 61].

Такође, бројне студије су рађене и са *Rituximab*-ом, химеричним моноклонским антителом, против површинског *B*-ћелијског антигена *CD20*, који доводи до престанка продукције антитела од стране плазмoцита. У прелиминарним студијама, примењен у стандардној дози од 375 mg/m^2 се показао ефикасним код 35–65% болесника са резистентном хроничном ИТП, али је примећено да много бољи ефекат има код секундарних имуних тромбоцитопенија, у склопу системског лупуса, *Ewans*-овог синдрома и слично. Може дати бројне нежељене ефекте током примене, а не треба занемарити ни секундарно насталу хуморалну имунодефицијенцију, због чега се и даље примењује са опрезом, посебно у педијатријској популацији [62, 63].

У последњих неколико година су у оптицају студије 3. фазе код адултних пацијената са нереактивном хроничном ИТП са једним типом инхибитора тирозин киназе (*Fostamatinib*) који је специфичан само за слезинску тирозин киназу и на том месту делује имуномодулаторно и блокира активност ретикулоендотелијалног система у слезини, али је још увек рано говорити о терапијском ефекту овог лека [68].

И поред чињенице да је то мали број пацијената, ипак око 10% деце са хроничном резистентном ИТП нема адекватну реакцију на било који од до сада примењиваних терапијских модалитета и за сада нема консензуса о лечењу таквих пацијената [25, 37, 38, 52–55]. Обзиром да се хеморагијски синдром код њих јавља са неизвесном учесталoшћу и интензитетом, да имају често потребу за применом трансфузија деплазматисаних еритроцита и тромбоцита, и да болест има озбиљан утицај на квалитет живота, за клиничаре је њихово лечење озбиљан изазов.

1.6. Тест кинетике тромбоцита

Помоћу тромбоцита обележених изотопима, $^{51}\text{Hromom}$ или $^{111}\text{Indiumom}$ доказано је да 30% од укупне тромбоцитне масе чини слободан и изменљив део тромбоцита у слезини и да трећину свог живота тромбоцити проведу у слезини, због чега се овом органу придаје посебна пажња при испитивању пацијената оболелих од ИТП [69].

Извођење теста кинетике тромбоцита препоручује се код свих пацијената са акутном ИТП који имају слаб одговор на иницијално примењену терапију или код којих болест прогредира ка хроничном облику. Тестом се процењује животни век тромбоцита, индекс продукције и доминантно место деструкције, тј. индекс секвестрације тромбоцита (слезина, јетра, мешовито, неки други орган). Подаци добијени испитивањем кинетике тромбоцита могу бити опредељујући чиниоци при одлучивању о избору терапије (терапија друге и треће линије) и посебно при разматрању спленектомије као терапијске опције [69–72].

Такође, различите студије препоручују тест кинетике у склопу преоперативне одлуке о спленектомији као маркера прогнозе, посебно је уочена високо значајна корелација између резултата спленектомије и места секвестрације тромбоцита [69, 70, 72]. Са друге стране, Белгијска група истраживача сматра да преоперативни тест кинетике тромбоцита не треба препоручивати због неконзистентних резултата и непостојања довољне корелације [71]. Све ове студије су доминантно спровођене на адултним пацијентима. Друге студије су тест кинетике употребиле за процену исхода лечења пацијената са ИТП, али свакако тек се у будућности могу отворити нове могућности за употребу овог теста [73].

1.7. Повезаност оксидационог стреса / антиоксидационе заштите и ИТП

Оксидациони стрес (ОС) представља поремећену равнотежу између стварања реактивних кисеоничних (*Reactive Oxygen Species*) – *ROS* и азотних врста и индивидуалне способности организма да се детоксикују ове високо реактивне материје [74]. ОС може да оштети све биолошке молекуле, као што су ДНК, протеини, липиди и слично, са највећим ефектом на *target* протеине, јер долази до посттранслационе модификације аминокиселина, чиме се мења њихова физичка или хемијска структура [74, 75]. Оксидација бочних ланаца, цепање или умножавање аминокиселинских остатака и формирање нових реактивних група је праћено губитком функције протеина, а може довести и до развоја цитотоксичних нуспроизвода и/или протеинских агрегата и може изазвати стварање измењених или нових епитопа [74, 75]. То говори у прилог огромне улоге ОС у процесима аутоимуности, јер се на овај начин врши *B*- и *T*-ћелијска дисрегулација и формирање аутоантитела [76]. Бројне студије су показале везу између оксидационог стреса и аутоимунских болести. Аутоантитела са друге стране, везана за липиде у мембрани различитих ћелија могу имати улогу у повећању липидне пероксидације и редукције антиоксидационог капацитета организма (*Antioxydant Defence System* – *ADS*), који ограничава оштећења настала деловањем *ROS* [74–76]. Имајући у виду наведене чињенице, да слободни кисеонични радикали могу да узрокују структурна и функционална оштећења различитих ћелија, њихово уклањање из организма може да представља теоријску базу за лечење бројних аутоимунских болести [77].

Прекомерна производња реактивних врста кисеоника и неадекватан антиоксидациони капацитет резултирају неравнотежом у редокс систему (балансу) [74]. Након покретачког догађаја као што је нпр. инфекција, вакцина, убод инсекта и слично, започиње процес уништавања тромбоцита обложених антителима од стране моноцитно–макрофагног система. Ослобођени страни пептидни фрагменти тромбоцита се поново представљају *T*- и *B*-лимфоцитима [18–20]. Док се синтеза антитела наставља

стимулацијом *B*-лимфоцита, периферна деструкција тромбоцита се наставља услед активације цитотоксичних *T*-лимфоцита [18, 19]. Током уништавања тромбоцита у ретикулоендотелном систему и на периферији настају реактивне врсте кисеоника [30]. Повећање нивоа *ROS* изазива смањење укупног антиоксидационог капацитета и повећање укупног оксидационог статуса. Као резултат повећаног *ROS* долази до липидне пероксидације ДНК, протеина и липида. Такви протеини са модификованом антигенском структуром су високо имуногени и могу генерисати поновни одговор антитета стимулацијом адаптивног имуног система и тако се прави *circulus vitiosus* [18, 19, 30].

Остаје нејасно да ли ОС изазива аутоимуност или је резултат аутоимуне дисрегулације, што би могло објаснити релативно спор напредак у овој области истраживања. За педијатријски ИТП, познато је да вирусне инфекције представљају покретач тромбоцитопеније, док због дугог времена инкубације није могуће обезбедити доказе да су инфекције такође узрок тромбоцитопеније код одраслих. Како стварање слободних радикала припада одбрамбеним механизмима домаћина против инвазивних патогена (иницијалних покретача ИТП), велика је вероватноћа да је ОС присутан пре аутоимуне дисрегулације [30, 74, 78]. Међутим, и овај аспект патофизиологије ИТП није дефинитивно разјашњен и добијени су неконзистентни резултати.

Нека претходна истраживања су показала да је оксидациони стрес дефинитивно укључен у патогенезу ИТП, а такође је показано да пацијенти са ИТП са активном болешћу, па и они у ремисији, имају значајно смањен антиоксидациони капацитет тромбоцита [30, 78–80]. Први извештаји о оксидационој дисрегулацији код неутрофила пацијената са акутном ИТП датирају још из 1984. године у раду *Ohno* и сарадника [81]. Деведесетих година прошлог века, аскорбинска киселина, као познати антиоксиданс, коришћена је за лечење акутне ИТП, са 7 од 11 (63,6%) пацијената који су позитивно реаговали. Међутим, неколико група истраживача касније није успело да репродукује овакве резултате [82, 83].

Постоји одређен број студија које су показале да је ниво оксидационог стреса значајно повишен код пацијената са ИТП и да може корелирати са тежином болести и бројем тромбоцита [80]. Постоје аутори који сматрају да пацијенти са ИТП имају смањену антиоксидациону заштиту и да најзначајну улогу у патогенези ИТП играју липидна пероксидација мембране тромбоцита и смањена антиоксидациона одбрана, због чега су код њих тромбоцити мета напада оксидационог стреса. Међутим, директно поређење са здравим контролама открило је да пацијенти са ИТП заиста имају значајно више нивое ОС, али само умерено, али не и статистички значајно смањене капацитете антиоксидационе заштите [84]. Друга група аутора је у једној интервентној двоструко слепој студији са употребом плацеба у неинтервентној групи, доказала корист од антиоксидационих средстава као адјувантне терапије и код акутне и код хроничне ИТП [30]. Такође, кинеска група истраживача је у једној мултицентричној студији на преко 100 пацијената са ИТП показала одличне резултате лечења кофеинском киселином као антиоксидантом, међутим у ову студију су били укључени само блажи клинички облици [85].

У једном истраживању је доказано да жене са ИТП имају значајно више нивое ОС у поређењу са здравим женским контролама и мушким пацијентима са ИТП, што указује и на родно специфичне разлике у патофизиологији ИТП и ОС [86]. Оксидациони стрес код жена је такође већи и у другим патолошким стањима као што су коронарна и неуродегенеративна болест, атеросклероза и неколико врста карцинома, као и Паркинсонова и Алцхајмерова болести. Пол је повезан са разликама у клиничкој презентацији, почетку, прогресији и исходу одређених аутоимуних болести. Укратко, жене имају јаче ћелијске и хуморалне имунолошке реакције у поређењу са

мушкарцима, а полни хормони су вероватно делимично одговорни за већу појаву аутоимуних поремећаја код жена. Утврђено је да полни хормони (нпр. естроген) имају имуномодулациона својства и утичу на урођене и адаптивне имуне ћелије, презентацију антигена, секрецију цитокина и стварање аутоантитела [86, 87], тако да и полно специфичне разлике у патофизиологији ИТП треба узимати у разматрање.

Поједине колеге су чак доказали да код пацијената са ИТП постоје различити молекуларни механизми и различити обрасци експресије гена хроничног ИТП у поређењу са акутним, што може да имплицира и различиту патогенезу ова два стања када су у питању ОС и *ADS*, посебно код оних пацијената којима није потребно лечење [88]. Још једна разлика је примећена у равнотежи тиол / дисулфида, која је поремећена у корист дисулфида код акутног ИТП, а та равнотежа остаје стабилна код хроничних ИТП пацијената, посебно оних са лакшом клиничком сликом, којима није потребно лечење [89]. Са друге стране, код одраслих пацијената са ИТП, су пријављени повишени нивои малонил-диалдехида у плазми и еритроцитима, а смањени еритроцитни глутатион и аскорбинска киселина, па на основу тога *Polat* и сарадници сматрају да липидна пероксидација мембране тромбоцита и смањена антиоксидациона одбрана играју значајну улогу у патогенези ИТП [84]. На репрезентативном узорку од 84 одрасла пацијента са хроничном ИТП, *Yin* и сарадници су приметили да серумски азот моноксид, глутатион, глутатион дисулфид, малонил-диалдехид, супероксид дисмутаза и нивои каталазе и глутатион пероксидазе имају јаке корелације са бројем тромбоцита [90]. Оно што је занимљиво, да су и поједине тромбоцитопеније узроковане леком, такође повезиване са патофизиолошким механизмима у којима је доминантна улога оксидативног стреса [91].

Такође, многи аутори који су се бавили темом оксидационог стреса увидели су да би теоријски смањење формирања слободних радикала требало да буде ефикасније од покушаја да се неутралишу слободни радикали након њихове производње. Ово се свакако предлаже код адултних особа променом животних навика у смислу ограничења калорија, вежбањем које повећава мишићне нивое супероксид дисмутазе, глутатион пероксидазе и смањује глутатион, затим избегавање стреса и слично. То посебно долази до изражаја у кардиоваскуларним болестима, где је један од најважних патофизиолошких процеса липидна пероксидација под дејством *ROS* липопротеина мале молекулске масе, чиме се започиње процес атеросклерозе или липопротеина велике молекулске масе који не могу да спроведу своју протективну улогу у овом процесу [92]. Међутим, јасно је да је патофизиологија како ИТП, тако и других аутоимуних болести, много компликованија, посебно у дечијем организму, који у највећој мери још увек није оштећен неправилним стилем живота.

Параметри и сигнални путеви оксидационог стреса постају и једне од мета нових терапијских, експерименталних лекова, али су свакако потребне даље студије о патогенези и патофизиологији ИТП да би се открили нови терапијски циљеви. Поједини аутори су користили патофизиолошки концепт повећаног ОС и смањеног интрацелуларног *ADS* у ИТП и означили активацију једног од тромбоцитних инфламазома као потенцијалну терапијску мету [93].

Поред улоге оксидационог стреса и антиоксидационе заштите на тромбоците у периферној крви, неке од струдија су показале да редокс систем има утицаја и на апоптозу мегакариоцита у костној сржи, па је тако доказано да је апоптоза мегакариоцита доминантно смањена код пацијената са ИТП у поређењу са здравим контролама [94]. Недавно је чак доказано да постоје егзозоми из сигналних путева антиоксидационе заштите који су добијени из плазме пацијената са ИТП, који су идентификовани као један од битнијих фактора који смањују број апоптотичких мегакариоцита у костној сржи. Међутим, примена таквих егзозома добијених из плазме

пацијената са ИТП код озрачених мишева је продужила тромбоцитопенију, тако да је и ово један од индиректних доказа озбиљно комплексне патофизиолошке основе болести [94, 95].

1.8. Улога појединих параметара ОС / ADS у патофизиологији ИТП

Азот моноксид (*NO*) је један од највише испитиваних параметара оксидационог стреса, првобитно описан као фактор релаксације из ендотела, важан је молекул који је укључен у многе физиолошке и патолошке процесе. Као антикоагуланс, *NO* изазива вазорелаксацију и такође инхибира адхезију и агрегацију тромбоцита, и као такав, опсежно је проучаван у кардиологији због његове улоге у атеросклерози и исхемијској болести срца. Важна алтернативна функција *NO* је у модулацији производње тромбоцита из мегакариоцита. ИТП може бити повезана са смањењем биорасположивости *NO* што доприноси тромбоцитопенији. Међутим, у одбрани домаћина од вируса, *NO* је такође један од кључних посредника за имуне функције макрофага. Имунолошке студије фаворизују неравнотежу у подгрупама *CD4* помоћничких *T* лимфоцита у патогенези ИТП, са доказима који подржавају поларизацију у правцу *Th1* имунолошког одговора *in vitro*. Имунолошка регулаторна улога *NO* је одавно препозната у смислу да селективно инхибира експанзију *Th1* ћелија негативном повратном спрегом након инфекција и антигенске стимулације. Азот моноксид се помоћу ензима азот оксид синтетазе продукује из *L*-аргинина, а недостатак аргинина (*Arg*) је такође био повезан са смањеном концентрацијом интратромбоцитног азотног оксида, активацијом тромбоцита и тромбоцитопенијом. Са друге стране, асиметрични диметиларгинин (*ADMA*) је метаболички нуспроизвод континуираних процеса модификације протеина у цитоплазми свих људских ћелија. Уско је повезан са *L*-аргинином, настаје његовом деградацијом и он омета и блокира *L*-аргинин у производњи *NO* [96].

Још један параметар детаљно испитиван у процесима атеросклерозе и исхемијске болести срца је оксидовани липопротеин мале молекулске масе (*oxLDL*), за кога се такође очекује да буде повишен у серуму пацијената са ИТП, након липидне пероксидације мембране тромбоцита и "респираторног праска" неминовно је да ће доћи и до прекомерне оксидације *LDL*. Међутим, за сада је његова улога детаљно испитивана у процесима тромбозе, док се код тромбоцитопенија помиње само у случају улоге у патогенези појединих тропских болести, попут маларије, затим системског лупуса или тромбоцитопеније узроковане употребом лекова [91, 97, 98].

Примарна улога фагоцита је одбрана домаћина од различитих микроорганизама, које убијају фагоцитозом. Један од механизма који користе је стварање фагозома, формације која настаје након ендоцитозе микроорганизама унутар цитоплазме фагоцита, а један од механизма њиховог убијања је ослобађање *ROS* и протеолитичких ензима унутар фагозома. *ROS* се генерише у процесу "респираторног праска" унутар фагозома, којим се троше велике количине кисеоника, који се након тога претвара у високореактивне супероксидне радикале супероксид ањон радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2), који играју важну улогу у елиминацији микроорганизама [99]. Ако знамо да је инфекција један од главних покретача имуног одговора у патогенези ИТП, а такође и један од главних узрока настанка релапса код пацијената код којих болест дуже траје, јасно нам је зашто се ови параметри ОС издвајају као једни од најзначајнијих.

Сличним механизмима се може објаснити и липидна пероксидација мембране тромбоцита. Антигена мимикрија која покреће развој антитромбоцитних аутоантитела и појачана фагоцитна активност макрофага су имплицирани као патогенетски механизми којим започиње процес уништавања тромбоцита обложених аутоантителима

и ослобађају се нови страни пептидни фрагменти, који се поново представљају T- и B-лимфоцитима и врше поновну стимулацију имуног система. Као резултат свих ових процеса долази до повећане липидне пероксидације мембране тромбоцита, ДНК, различитих протеина и липида. Очекивано је да се сличан процес дешава и у стањима релапса [80, 99].

Са друге стране, супероксид димутаза (*SOD*), глутатион пероксидаза (*GSH*) и каталаза (*KAT*) учествују у прављењу баланса ОС / *ADS*, јер треба да детоксикују супероксидне радикале, пре свега O_2^- и H_2O_2 и да ублаже липидну пероксидацију. У многим аутоимуним процесима, па тако и код ИТП, је доказано да вредности антиоксидационих капацитета значајно утичу на испољавање и прогнозу болести [30, 78, 80].

Када говоримо о циклооксигеназном систему у тромбоцитима, тј. метаболизму арахидонске киселине, посебно о простаглицину (*PgI2*) и тромбоксану A_2 (*TxA2*), поједине студије су доказале да код пацијената са ИТП дефинитивно постоји хиперактивност тромбоцитне циклооксигеназе *in vivo* [13, 100], што очекивано доводи до иницијалног повећања вредности *PgI2* и *TxA2*, с обзиром на појачану деградацију тромбоцита у ретикулоендотелијалном систему и ослобађању свих материја из тромбоцитних гранула [2–7]. Али у наставку процеса, као компензаторни механизам, вредности *PgI2*, као вазодилататора и једног од најачих инхибитора агрегације тромбоцита, се смањују, а вредности *TxA2* се повећавају јер је потребно да тако смањен број тромбоцита у ИТП компензаторно хиперагрегира [13, 100]. Поред тога, на експерименталном моделу мишева је доказано и да оба метаболита арахидонске киселине имају битну негативну улогу и утицај на успорену Мкц-поезу у косној сржи [100].

Хиперхомоцистеинемија, иако ретка у дечијем узрасту, а описивана детаљно у патофизиологији тромбозе, кардиоваскуларних догађаја и исхемијске болести мозга, изазива ендотелну дисфункцију и оштећење биорасположивости азотног оксида у животињским моделима и студијама ћелијске културе. Један од могућих механизма деловања хомоцистеина је стварање водоник пероксида и супероксид ањона, који повећава оксидациону деградацију азотног оксида. Као такав, дефинитивно теоријски може учествовати и у патогенези ИТП, мада до сада не постоје студије које су повезале ова два ентитета, али јесте повезивана улога аберантне ДНК метилације у ИТП, што теоријски може послужити као мета за нове, експерименталне лекове [101, 102].

Због свих ових непознаница и неконзистентних података у различитим истраживањима, одређивање вредности параметара ОС и *ADS* код деце са ИТП евентуално може да допринесе разјашњењу како дијагностичких, тако и терапијских, а можда и прогностичких дилема, тј. могућности предвиђања даљег тока болести. У овој студији смо имали за циљ да проценимо вредности прооксиданата и антиоксиданаса код деце са различитим облицима и стадијумима ИТП пре и после примене одговарајуће терапије. Резултати добијени из ове студије могу бити од клиничког значаја с обзиром да са практичног аспекта бацају ново светло на молекулски механизам настанка ИТП и доприносе прецизнијем диференцирању појединих форми болести и сагледавању њихових специфичности. Корелација параметара ОС са формом ИТП и тежином клиничке слике може да укаже на њихов предиктивни значај у процени ефикасности терапије, као и прогнози болести. Корелација вредности параметара *ADS* би могла да укаже на потенцијални клинички значај примене антиоксиданаса у терапији ИТП.

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ РАДА

2.1. Циљеви рада

I. Генерални циљ

1.) Одредити ниво оксидационог стреса код деце са различитим формама ИТП, одређивањем концентрације следећих параметара у узорку крви испитаника: супероксид анјон радикал (O_2^-), индекс липидне пероксидације мерен као *Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)*, водоник пероксид (H_2O_2), азот моноксид (NO), хомоцистеин (HCY), оксидовани липопротеин мале молекулске масе ($oxLDL$), аргинин (Arg), простациклин (PgI_2), тромбоксан A2 (TxA_2) и асиметрични диметиларгинин (АДМА).

2.) Одредити активност антиоксидационог система одбране код деце са различитим формама ИТП, одређивањем концентрације следећих параметара у узорку крви испитаника: редуковани глутатион (GSH), супероксид дисмутаза (SOD) и каталаза (КАТ).

3.) Анализирати клиничке и лабораторијске карактеристике деце оболеле од различитих форми ИТП

II. Специфични циљеви:

1.) Утврдити значајност разлике нивоа биомаркера оксидационог стреса код деце са различитим формама ИТП;

2.) Утврдити значајност разлике капацитета антиоксидационе заштите код деце са различитим формама ИТП;

3.) Испитати степен корелације вредности параметара оксидационог стреса и активности антиоксидационе заштите и тежине клиничке слике, тј. степена крварења код деце са различитим формама ИТП;

4.) Испитати степен корелације вредности маркера оксидационог стреса и система антиоксидационе одбране и терапијског одговора код деце са новооткривеном ИТП;

5.) Испитати степен корелације вредности маркера оксидационог стреса и антиоксидационе заштите и примењене суплементације препаратом аскорбинске киселине код деце са хроничним обликом ИТП;

6.) Испитати корелацију између броја придружених болести и/или присуства неспецифичних аутоантитела код деце са ИТП и вредностима маркера оксидационог стреса и система антиоксидационе одбране;

7.) Испитати корелацију између резултата теста кинетике тромбоцита (дужина животног века, индекса продукције и индекса секвестрације, тј. места разградње тромбоцита) и вредности маркера оксидационог стреса и система антиоксидационе одбране код деце са хроничном ИТП;

8.) Испитати утицај појединих клиничких и лабораторијских параметара на исход лечења и прогнозу код различитих форми ИТП код деце;

2.2. Хипотезе рада

1.) Вредности маркера оксидационог стреса су значајно повишене у новооткривеној форми ИТП у односу на перзистентну и хроничну форму болести;

2.) Вредности маркера оксидационог стреса су значајно повишене, а антиоксидационог система снижене код свих облика ИТП у односу на контролне групе;

3.) Вредности маркера оксидационог стреса су значајно повишене у новооткривеној форми ИТП пре почетка лечења у односу на стање ремисије након примене различитих модалитета лечења (интравенски имуноглобулини, различити протоколи кортикостероидне терапије);

4.) Вредности маркера оксидационог стреса су повишени код пацијената са тежом клиничком сликом (израженијим степеном крварења) у свим формама болести, као и код пацијената са нижим бројем тромбоцита;

5.) Испитаници са блажом формом болести (било који облик) и већим бројем тромбоцита имају активнији систем антиоксидационе заштите;

6.) Примена препарата аскорбинске киселине код пацијената са хроничном формом болести ће побољшати активност система антиоксидационе заштите и редуковати вредности биомаркера оксидационог стреса;

7.) Вредностима биомаркера оксидационог стреса су повишене, а система антиоксидационе одбране снижене код пацијената са ИТП који имају неку придружену аутоимуноу болест или позитивна неспецифична аутоантитела, у односу на пацијенте са изолованом ИТП, без аутоантитела;

8.) Пацијенти са хроничном формом болести и краћим животним веком тромбоцита, смањеним индексом продукције и повећаним индексом секвестрације тромбоцита имају више вредности маркера оксидационог стреса, а мању ефикасност система антиоксидационе заштите.

9.) Поједини клинички параметри попут пола, узраста, дужине трајања болести, врсте и степена крварења, присуство других болести код испитаника и у породици, примене трансфузија, као и поједини лабораторијски параметри попут броја и величине тромбоцита, процента мегакариоцита у костној сржи, вредности лактичне дехидрогенезе, позитивних различитих аутоантитела, позитивног антигена на *Helicobacter pylori* у столицу, нивоа витамина Д, величине слезине, значајно утичу на исход лечења и прогнозу ИТП код деце.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

3.1. Врста студије

Ово клиничко истраживање је дизајнирано као проспективно, кохортно и опсервационо, а у фокусу има проучавање одређених параметара код деце узраста од 6 месеци до 18 година са дијагнозом идиопатске тромбоцитопеничне пурпуре. Истраживање је трајало 24 месеца, а сва испитивања су се спроводила у току актуелних хоспитализација или амбулантних прегледа деце са различитим облицима ИТП.

3.2 Популација која се испитује

У истраживање је укључено укупно 102 детета подељених у 4 групе.

1.) Новооткривена ИТП (нд ИТП): 27 деце различитог узраста и пола хоспитализованих на одељењу хематоонкологије Клинике за Педијатрију, Универзитетског Клиничког центра Крагујевац, са бројем тромбоцита у комплетној крвној слици (ККС) $<150 \times 10^9/l$, са неким од знакова хеморагијског синдрома или асимптоматски, код којих су лабораторијским испитивањем искључени други узроци тромбоцитопеније. Клиничка и лабораторијска евалуација пацијената са нд ИТП је спроведена при постављању дијагнозе и 24h након примене последње дозе интравенских имуноглобулина.

2.) Перзистентна ИТП (п ИТП): 22 деце различите доби и пола чија болест траје дуже од 3, а краће од 12 месеци. Испитивани су пацијенти који су у прва три месеца болести након иницијалне терапије ив имуноглобулинима, лечени различитим терапијским модалитетима системске кортикостероидне терапије. У п ИТП групи клиничка и лабораторијска евалуација је вршена пре и после системске терапије кортикостероидима, као и у време евентуалног релапса болести.

3.) Хронична ИТП (х ИТП): 29 деце различите доби и пола код којих болест траје дуже од 12 месеци, код којих је учињен тест кинетике тромбоцита радиоактивним обележивачем, који су лечени доступним методама лечења ИТП у претходном периоду (интравенски имуноглобулини, различити протоколи терапије системским кортикостероидима, имуномодулатори, агонисти тромбопоетина, спленектомија). Код пацијената са х ИТП клиничка и лабораторијска евалуација је вршена при постављању дијагнозе, месец дана након суплементације препаратом аскорбинске киселине у дози 2 g дневно и у случају погоршања (евентуалног релапса) болести.

4.) Контролне групе: а.) 12 здраве деце различитог узраста и пола која су дошла на контролни преглед у хематолошку амбуланту Педијатријске клинике најмање месец дана након завршеног лечења сидеропенијске анемије препаратима гвожђа; б.) 12 здраве деце различитог узраста и пола која су раније боловала од ИТП и у стабилној комплетној клиничкој и лабораторијској ремисији су најмање 12 месеци (и ИТП). Контролним групама клиничка и лабораторијска евалуација је вршена једнократно.

Истраживање је реализовано као академско и непрофитно, према принципима Добре клиничке праксе, Добре лабораторијске праксе и Хелсиншке декларације. Од оба родитеља и деце старије од 7 година, су тражени писани, добровољни пристанци, уз потпуну обавештеност. Истраживање је одобрено од стране Етичког одбора Универзитетског Клиничког центра Крагујевац (одобрење под редним бројем 01-22-656).

3.3. Узорковање испитаника

Узорковање испитаника се обављало из популације деце са дијагнозом ИТП, која су била хоспитализована на одељењу хематоонкологије Клинике за Педијатрију, Универзитетског Клиничког центра Крагујевац, која су испуњавала укључујуће критеријуме, као и из популације деце која су долазила на заказане контролне прегледе у хематоонколошку амбуланту Клинике за Педијатрију, Универзитетског Клиничког центра Крагујевац. Сваки пацијент је прегледан од стране педијатра хематолога ради утврђивања укључујућих и искључујућих критеријума. Свим испитаницима крв је вађена између 07 и 09 сати ујутру, пре оброка.

3.3.1. Критеријуми за укључивање испитаника у студију

- 1.) потписан формулар информисаног пристанка за учешће у истраживању од стране оба родитеља и деце старије од 7 година
- 2.) постављена дијагноза новооткривене ИТП према водичима *American Society of Hematology* (тромбоцитопенија са нормалним или повећаним волуменом тромбоцита у ККС или цитолошком прегледу размаза периферне крви и/или повећаним или нормалним бројем мегакариоцита у пунктату костне сржи, уз искључење других узрока тромбоцитопеније) [25]
- 3.) за перзистентни и хронични облик болести испуњавање услова о дужини трајања болести
- 4.) испуњавање услова о дужини трајања стабилне комплетне ремисије за испитанике из контролне групе

3.3.2. Критеријуми за искључивање испитаника из студије

- 1.) асимптоматски пацијенти са сниженим бројем тромбоцита, код којих је тестирањем са натријум цитратом постављена дијагноза псеудотромбоцитопеније [21]
- 2.) одојчад млађа од 6 месеци са дијагнозом неонаталне тромбоцитопеније
- 3.) деца са неким обликом тромбастеније (нпр. *Bernard Soulier* синдром)
- 4.) труднице до 18. године са ИТП
- 5.) деца са ИТП и било каквим поремећајем хемостазе (нпр. *Von Willebrand*-ова болест, Хемофилије, хипофибриногенемија)
- 6.) деца са ИТП и сидеропенијском анемијом
- 7.) деца са *Evans*-овим синдромом (аутоимуна тромбоцитопенија и/или хемолитичка анемија и/или леукопенија)
- 8.) деца са ИТП и другим болестима који захтевају примену хроничне терапије (астма, бубрежни болесници, онколошки пацијенти и слично)
- 9.) витално угрожени пацијенти са ИТП који су у тренутку тестирања захтевали и трансфузије концентрованих тромбоцита и/или деплазматисаних еритроцита
- 10.) деца са хроничним обликом ИТП и суспектном или доказаном нефролитијазом или породичним оптерећењем за бубрежне калкулусе
- 11.) привременим искључујућим критеријумом је сматрана акутна вирусна или бактеријска инфекција код деце са ИТП до излечења од исте

3.4. Варијабле које се мере у студији

Код деце са постављеном дијагнозом новооткривене ИТП првог дана хоспитализације, пре ординирања терапије, и код деце са перзистентном и хроничном ИТП који су позивани телефоном у тренутку када испуњавају укључујуће критеријуме, након комплетног физикалног прегледа и потписивања формулара информисаног пристанка за учешће у студији, извршено је узимање узорака крви за одређивање вредности студијских варијабли.

На основу добијених анамнестичких података, попуњаван је упитник у форми табеле који садржи следеће податке о пацијенту: године живота, пол, доминантна места крварења, учесталост и степен хеморагијског синдрома према *Bleeding severity score*-у, придружене друге аутоимуне болести, породично оптерећење (ИТП, болести штитасте жлезде, инфекција *Helicobacter pylori*), фактор ризика за појаву или рецидив ИТП (инфекција у претходне 4 недеље, вакцинација, ујед инсекта, хирушка интервенција, употреба лекова), за перзистентне и хроничне облике податке о врсти и дужини спроведене терапије за ИТП, податке о последњем употребљаваном терапијском модалитету, податке о учесталости примене трансфузија деплазматисаних еритроцита и концентрованих тромбоцита.

Према тежини клиничке слике (субјективна процена степена крварења од стране хематолога – *Bleeding severity score*, оценама од 0 до 4 на 4 различита места (усна дупља, епистакса, кожа и остала крварења (интраабдоминална, хематурија, метрорагија, интракранијална), током последња 24 часа) сви пацијенти су подељени у четири категорије: 1. асимптоматски (оцена 0), 2. са благим знацима хеморагијског синдрома (оцене 1–4), 3. са средње израженим знацима хеморагијског синдрома (оцене 5–8), 4. израженим знацима хеморагијског синдрома (оцене 9–16) [41, 42].

Свим пацијентима је урађена комплетна крвна слика (ККС) са цитолошким прегледом размаза периферне крви, параметри скрининга хемостазе, основни биохемијски параметри, антитиреоглобулинска, антинуклеусна антитела, антикардиолипинска и лупус антикоагуланс антитела, *Coombs* тест, хормонски статус штитасте жлезде, антиген на *Helicobacter pylori* у столицу, вредности подкласа имуноглобулина, вредност витамина Д у серуму, ехосонографски преглед абдомена којим је анализирана величина слезине и присуство акцесорних слезина, код новооткривених случајева цитолошки преглед аспириата костне сржи, код хроничних пацијената тест кинетике тромбоцита.

Првог дана пријема је узет и узорак крви за одређивање следећих биохемијских параметара: супероксид анјон радикал (O_2^-), индекс липидне пероксидације мерен као *TBARS*, водоник пероксид (H_2O_2), азот моноксид (*NO*), хомоцистеин, оксидовани липопротеин мале молекулске масе (*oxLDL*), аргинин (Арг), простациклин (*PgI2*), тромбоксан (*TxA2*) и асиметрични диметиларгинин (АДМА) и редуковани глутатион (*GSH*), супероксид дисмутаза (*SOD*) и каталаза (КАТ).

Одређивање ККС са цитолошким прегледом размаза периферне крви

Одређивање ККС се обављало у лабораторији Клинике за Педијатрију, из кивета са ЕДТА као антикоагулансом на аутоматском бројачу "*DxH500*" марке *BECKMAN COULTER*. Размаз периферне крви је прављен на предметном стаклу $22 \times 76 \text{ mm}$, бојен *May Grunwald Gimsa* методом и након тога микроскопиран.

Одређивање параметра скрининга хемостазе

Параметри скрининга хемостазе: активирано парцијално тромбoplastинско време (*aPTT*), протромбинско време (*PT*), *International normalised ratio (INR)* и фибриноген су одређивани у лабораторији Клинике за Педијатрију, из епрувете са натријум цитратом као антикоагулансом у односу 1:9, где су након центрифугирања од 10 минута на 3000 обртаја, резултати читавати на апарату *ACL ELIT-PRO* марке *INSTRUMENTATION LABORATORY*.

Одређивање нивоа аланин (АЛТ) и аспартат аминотрансферазе (АСТ)

Одређивање АЛТ и АСТ у серуму ензимском квантитативном методом се вршило на *Alinity C* анализатору у Централној лабораторији УКЦ Крагујевац. АЛТ из

узорка катализује пренос аминок групе са L–аланина на α –кетоглутарат при чему настају пируват и L–глутамат. Пируват у присуству никотинамид аденин динуклеотида (*NADH*) и лактичне дехидрогеназе редукује се у L–лактат. АСТ из узорка катализује пренос аминок групе са L–аспартата на α –кетоглутарат при чему настају оксалацетат и L–глутамат. Оксалацетат у присуству *NADH* и малат дехидрогеназе редукује се у L–малат. У овим реакцијама *NADH* се оксидује у *NAD*⁺. Реакција се прати мерењем брзине опадања апсорбанце на 340 nm услед оксидације *NADH* у *NAD*⁺ и пропорционална је концентрацији АЛТ и АСТ у серуму.

Одређивање вредности лактичне дехидрогеназе (ЛДХ)

Кинетички УВ тест на апарату *Olympus* се користио за квантитативно одређивање ЛДХ у серуму у Централној лабораторији УКИЦ Крагујевац. ЛДХ катализује оксидацију лактата у пируват, заједно са редукцијом *NAD*⁺ у *NADH*. Повећање концентрације *NADH* се мери на 340 nm и директно је пропорционално ензимској активности ЛДХ у узорку.

Одређивање вредности урее

Кинетички УВ тест на апарату *Olympus* се такође користио и за квантитативно одређивање урее у серуму у Централној лабораторији УКИЦ Крагујевац. Уреа се хидролизује у присуству воде и уреазе и продукује амонијак и угљен диоксид. Амонијак произведен у првој реакцији у комбинацији са 2–оксиглутаратом и *NADH* у присуству глутамат дехидрогеназе ствара глутамат и *NAD*⁺. Мерење брзине опадања апсорбанце *NADH* на 340 nm је пропорционално концентрацији урее у серуму.

Одређивање вредности креатинина

Апарат *Olympus* се такође користио и за ензимско квантитативно одређивање креатинина у серуму у Централној лабораторији КЦ Крагујевац. Креатинин се хидролизује до креатина помоћу креатининазе, а креатин се хидролизује до саркозина и урее помоћу креатиназе. Саркозин оксидаза катализује оксидативну диметилацију саркозина и формира се глицин, формалдехид и водороден пероксид. У присуству пероксидазе, водороден пероксид формира реакцију квантитативне оксидације кондензацијом са N-(3-сулфопропил)-3-метокси-5-метиланилином и 4-аминоантипирином до формирања плавог пигмента. Концентрација креатинина је пропорционална промени у апсорбанци на 600/700 nm.

Одређивање вредности мокраћне киселине

Одређивање вредности мокраћне киселине у серуму се вршило на *Alinity C* анализатору у Централној лабораторији УКИЦ Крагујевац. Мокраћна киселина се оксидује у алантоин помоћу урат оксидазе уз производњу водоник пероксида (*H₂O₂*). *H₂O₂* реагује са 4-амино антипирином и N-(3-сулфопропил)-3-метокси-5-метиланилином у присуству пероксида дајући обојени хинонимин. Повећање апсорбанције на 604 nm директно је пропорционално концентрацији мокраћне киселине у узорку.

Одређивање нивоа антинуклеусних антитела (ANA)

ANA се одређују помоћу *Alegria* теста у имунолошкој лабораторији УКИЦ Крагујевац, а принцип су индиректни флуоресцентни тест и ензимски имунотест (елиза), који се базирају на реакцији везивања антигена и антитела. Интензитет добијене плаве боје мерен фотометријски на 650 nm корелира са концентрацијом антиген–антитело комплекса.

Одређивање нивоа антикардиолипинских антитела

Антикардиолипинска антитела се такође одређују помоћу *Alegria* теста у имунолошкој лабораторији УКЦ Крагујевац индиректним флуоресцентним и ензимским имунотестом (елиза), базираним на реакцији везивања антигена и антитела. Интензитет добијене плаве боје мерен фотометријски на 650 nm корелира са концентрацијом антиген–антитело комплекса.

Одређивање хормонског статуса штитасте жлезде

Концентрација тиреостимулишућег хормона (*TSH*) је одређена имунорадиометријски употребом дијагностичког комплекта *IRMA TSH* произвођача *INER*. Концентрација слободног тироксина (fT4), антитиреоглобулинских и антитиреопероксидазних антитела је одређена радиоимунолошким тестовима који су засновани на конкуренцији радиообележеног и необележеног антигена, произвођача *CIS Bioassays, Gif sur Yvette*, Француска. Вредности су очитаване у гама бројачу у условима који су у складу са спецификацијама произвођача. Сва очитавања су спроведена у радиоимунолошкој лабораторији Центра за нуклеарну медицину, УКЦ Крагујевац.

Одређивање антигена на *Helicobacter Pylori* у столици

Квалитативна детекција антигена на *Helicobacter Pylori* у столици се одређује "*Cer Test*"-ом, а базирана је на принципу имунохроматографског теста и врши се у микробиолошкој лабораторији УКЦ Крагујевац.

Одређивање вредности класа имуноглобулина

Имунотурбидометријским тестом се одређивала квантитативна вредност имуноглобулина *M*, *G* и *A* класе у серуму или плазми. Узорак крви пацијента се меша са раствором одговарајућег антисерума, при чему се стварају нерастворљиви агрегати. Апсорбанца ових агрегата је пропорционална концентрацији тражених имуноглобулина у узорку. Тестирање се изводило у имунолошком одељењу Централне лабораторије УКЦ Крагујевац.

Одређивање вредности витамина Д у серуму

25-хидрокси витамин Д се квантитативно одређивао у серуму одложеним једностепеним хемилуминисцентним имуно тестом са микрочестицама (*СМИА*) на *Alinity I* анализатору у Централној лабораторији УКЦ Крагујевац.

Одређивање *Coombs* теста (директног и индиректног)

У Центру за трансфузиологију у узорак крви пацијента се апликује регенс, уколико дође до аглутинације (слепљивања) еритроцита, директни тест се сматра позитивним, а степен аглутинације се одређује квантитативно тест тракама. Након центрифугирања и издвајања плазме из узорка крви пацијента и мешањем са контролним еритроцитима, уколико дође до аглутинације, индиректни тест се сматра позитивним, а степен аглутинације се такође одређује квантитативно тест тракама.

Ехосонографски преглед абдомена

Ултразвучни преглед абдомена се изводио у ултразвучном кабинету Клинике за Педијатрију, УКЦ Крагујевац конвексном ултразвучном сондом опсега 5-7 Hz од стране педијатријских ултрасонографиста.

Тест кинетике тромбоцита

Извођење теста кинетике тромбоцита се спроводило на Институту за нуклеарну медицину у Клиничком центру Србије, у Београду. Тест се заснива на обележавању тромбоцита радиообележивачем тачно одређене радиоактивности која се израчунава на основу телесне масе, висине и узраста пацијента. Тромбоцити обележени ^{51}Cr или ^{111}In се апликују пацијенту и иницијално се процењује акумулација радиофармака у јетри у првих 20 минута, да не би дошло до прекомерног уноса, а затим се у наредним данима процењује животни век тромбоцита, индекс продукције и доминантно место деструкције (индекс секвестрације тромбоцита).

Припрема узорака за одређивање параметара ОС и ADS

У лабораторији Клинике за Педијатрију 3 ml крви је узимано у кивету са ЕДТА и центрифугирано 10 минута на 3000 обртаја. 1 ml добијене плазме се чувао у замрзивачу на -80°C за одређивање параметара антиоксидационог система. Остатак плазме се аспирирао и просипао, да би се издвојили само еритроцити. У епрувету са еритроцитима се додавао физиолошки раствор у односу 1/3 еритроцита и 2/3 физиолошког раствора и то се мешало неколико пута на вортексу, а затим центрифугирало 10 минута на 3000 обртаја и исти поступак се понављао још два пута. Након аспирације супернатанта и пипетирања 1 ml еритроцита, који се сипа у нову стаклену епрувету, додаје му се 3 ml хладне дестиловане воде да би се направила хемолiza. Таква епрувета се држала 30 минута у леденом купатилу, а након тога се такав узорак делио у 3 порције по 1 ml и чувао се у замрзивачу на -80°C за одређивање параметара оксидационог стреса. Поменути параметри су се одређивали у физиолошкој лабораторији Института Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

Одређивање концентрације супероксид анион радикала (O_2^-)

Принцип одређивања концентрације супероксид анион радикала (O_2^-) у узорцима крвне плазме користи реакцију O_2^- са нитро тетразолијум плавим (*Nitro Blue Tetrazolium* - *NBT*) до нитроформаза плавог. Мерење се одвија на таласној дужини $\lambda=550\text{ nm}$.

Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)

Одређивање индекса липидне пероксидације се реализовало индиректно преко продуката реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Принцип ове методе се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (*MDA*) са тиобарбитурном киселином. Мерење се одвија на таласној дужини $\lambda=530\text{ nm}$.

Одређивање концентрације водоник пероксида (H_2O_2)

Метод одређивања концентрације водоник пероксида (H_2O_2) се базира на оксидацији фенол црвеног помоћу водоник пероксид реакције, коју катализује ензим пероксидаза из коњске ротквице (*Horse Radish Peroxidase* - *HRPO*). Финални резултат ове реакције је формирање једињења са максимумом апсорпције $\lambda_{\text{max}}=610\text{ nm}$.

Одређивање концентрације нитрита (NO_2^-)

Одређивање концентрације азот монооксида (*NO*) у форми нитрита (NO_2^-) се реализовало на основу количине ослобођених нитрита. Принцип ове методе подразумева коршћење *Griess* реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје љубичасту боју. Мерење се одвија на таласној дужини $\lambda=550\text{ nm}$.

Одређивање концентрације хомоцистеина (HCY)

Концентрација хомоцистеина у серуму се одређивала у лабораторији Клинике за Педијатрију, УКЦ Крагујевац, из епрувете са натријум цитратом као антикоагулансом, где су се након центрифугирања од 10 минута на 3000 обртаја, резултати читавали на апарату *ACL ELIT-PRO* марке *INSTRUMENTATION LABORATORY*.

Одређивање концентрације оксидованог LDL (oxLDL)

Оксидовани *LDL* се одређује помоћу ензимског имунотеста (елиза), који се базира на реакцији везивања антигена и антитела. Интензитет добијене плаве боје мерен фотометријски корелира са концентрацијом антиген-антитело комплекса.

Одређивање концентрације аргинина (Arg), простациклина (Pgl2) и тромбоксана A2 (TxA2)

Концентрације поменутих параметара су се одређивале помоћу ензимског имунотеста (елизе), који се базира на реакцији везивања антигена и антитела. Интензитет добијене боје се мери фотометријски и корелира са концентрацијом антиген-антитело комплекса.

Одређивање активности редукованог глутатиона (GSH)

За одређивање активности редукованог глутатиона (*GSH*) користила се спектрофотометријска метода по *Beutler*-у. Принцип методе се базира на на оксидацији глутатиона *GSH* помоћу 5,5-дителио-бис-6,2-нитробензоевом киселином.

Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)

За одређивање активности *SOD* се користила адреналинска метода. Принцип ове методе, која иначе припада групи метода "негативног" типа, је да се прати смањење брзине аутооксидације адреналина у алкалној средини, која је зависна од O_2^- . С обзиром да се O_2^- уклања од стране присутне *SOD*, долази до инхибиције реакције аутооксидације адреналина. Систем прати брзину промене аутооксидације адреналина преко промене апсорбанце на 480 nm, која је обрнуто пропорционална активности *SOD*.

Одређивање активности каталазе (КАТ)

За одређивање активности каталазе се корисила метода по *Beutler*-у. Принцип методе је спектрофотометријско праћење брзине разградње водоник-пероксида у присуству каталазе на таласној дужини 230 nm, при којој водоник пероксид апсорбује светлост.

3.5. Снага студије и величина узорка

На основу резултата претходно објављених студија извршен је прорачун величине узорка [30, 78–80, 84–87, 89–91]. Коришћен је компјутерски програм за статистичка прорачунавања величине групе *G*Power* и статистички тест за примарне варијабле, Т-тест за два независна узорка, уз $\alpha=0.05$, $\beta=0.2$ (Снага студије 80%) и расподеле испитаника бар 1:1. Тако је добијено да је потребно најмање 20 испитаника у сваком појединачном узорку.

3.6. Статистичка обрада података

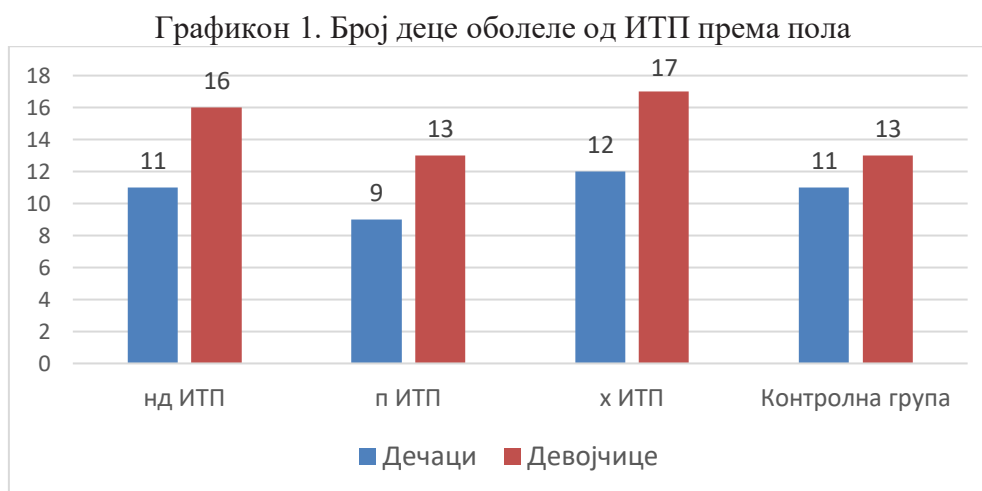
Добијени резултати су обрађени и приказани методама дескриптивне статистике. За континуалне варијабле коришћене су средње вредности \pm стандардна девијација, док је за категоријске варијабле приказана процентуална учесталост. Након провере нормалности расподеле података за континуалне варијабле *Kolmogorov–Smirnov* тестом, за процену утицаја независних варијабли на посматрани исход коришћен је одговарајући параметарски или непараметарски тест (Студентов Т тест или *Mann–Whitney U* тест). За процену значајности разлике у учесталости код континуалних варијабли коришћен је Студентов Т тест, а за категоријске варијабле коришћен је Хи-квадрат тест. Вредност $p<0.05$ је сматрана статистички значајном, а интервал поверења за све тестове био је 95%. За одређивање јачине повезаности варијабли коришћен је одговарајући коефицијент корелације (*Pearson* или *Spearman*) зависно од тога да ли подаци прате нормалну расподелу. Добијени резултати су груписани и приказани табеларно и графички. Сви подаци су анализирани коришћењем статистичког програма *IBM statistics SPSS* верзија 21.

4. РЕЗУЛТАТИ

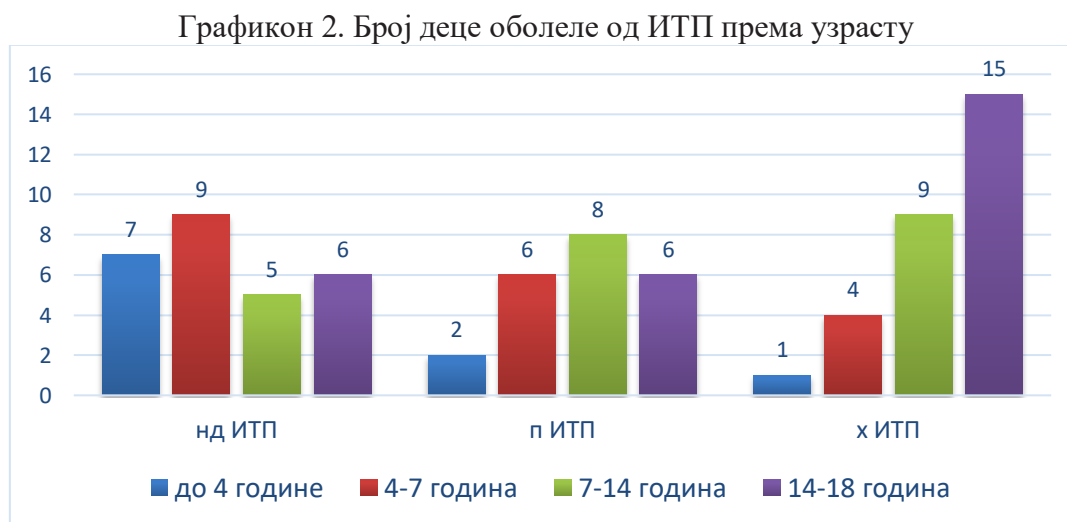
4.1. Клиничке и лабораторијске карактеристике деце оболеле од ИТП

Укупан број испитиване деце је био 102. Испитаници су подељени у 4 групе: 1) 27 деце са новооткривеном ИТП (нд ИТП); 2) 22 деце са перзистентном ИТП (п ИТП); 3) 29 деце са хроничном ИТП (х ИТП) и 4) 24 деце у контролној групи (12 здравих испитаника и 12 пацијената који су излечени од ИТП – и ИТП).

На Графикону 1. је приказана заступљеност деце према полу. Уочава се блага преминација девојчица код свих облика ИТП (Ж:М 1,2–1,3:1).



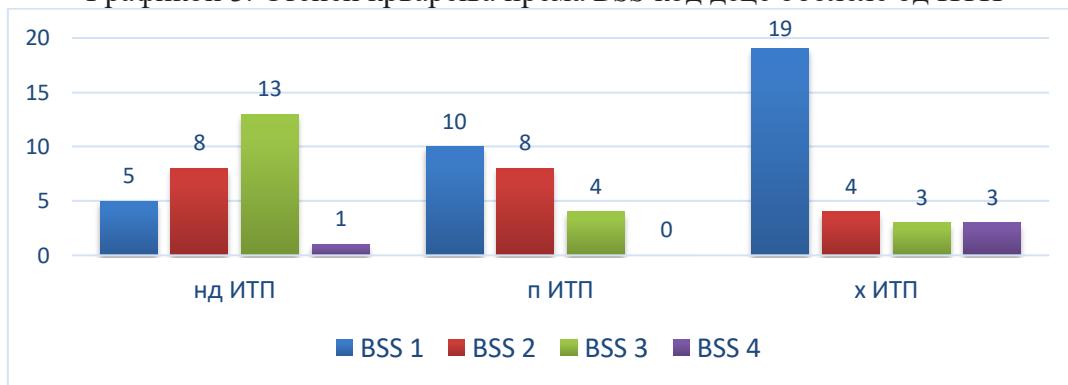
Просечна старост наших испитаника је била $8,7 \pm 3,8$ година, али је примећено да у групи х ИТП доминирају адолесценти, са заступљеношћу од око 55%, док од нд ИТП углавном обољевају деца предшколског узраста (60%) (Графикон 2.). Тако је просечна старост наших испитаника у групи деце са нд ИТП $7,4 \pm 2,5$ година, док је са друге стране у групи са х ИТП просечна старост је $14,5 \pm 3,7$ година



У нашој кохорти, скоро две трећине пацијената са х ИТП није имало јасан узрочни фактор који је покренуо имунолошки процес (инфекција, вакцина, ујед инсекта и слично) у време дијагностиковања болести. Са друге стране, у нашој нд ИТП групи скоро трећина пацијената нема података о јасном узрочном фактору (8/27), а од пацијената који су током периода праћења прешли у хроничитет код петоро од шесторо испитаника је болест почела без јасног покретачког узрока.

Тежина клиничке слике код наших пацијената је процењена према степену крварења на основу *Bleeding severity score (BSS)*, доминантним местима крварења; као и потребом за применом трансфузија деплазматисаних еритроцита и концентрованих тромбоцита током трајања болести. Међу нашим испитаницима са нд ИТП и п ИТП нема оних који су захтевали примену трансфузија компонента крви, док су 4 хронична пацијента због опсежних крварења имали потребу да приме трансфузије крви. Око половине пацијената са нд ИТП је имало средње тешка крварења при постављању дијагнозе, са друге стране 20% је било асимптоматско на презентацији болести. Међу перзистентним и хроничним пацијентима доминирају асимптоматски или са благим знацима хеморагијског синдрома, док 10% хроничних пацијената има средње тешка и тешка крварења (Графикон 3).

Графикон 3. Степен крварења према *BSS* код деце оболеле од ИТП



Убедљиво доминантна места крварења код наших пацијената су хематоми по кожи, док је крварење из гингива, епистаксе или из других слузница углавном јаља код пацијената са тежом клиничком сликом. Није било пацијената са интракранијалним и гастроинтестиналним крварењем (Графикон 4.).

Графикон 4. Доминантна места крварења код деце оболеле од ИТП



У свим испитиваним групама са ИТП деца доминантно немају других аутоимуних болести, али се учесталост мења зависно од облика болести, па 70% деце са нд ИТП је без других болести, док је тај проценат знатно мањи код п ИТП 55%, док је у х ИТП групи око 40%. Са друге стране, само су појединачни примери пацијената са болестима штитасте жлезде или неким метаболичким поремећајима у групама са нд ИТП и п ИТП, док је тај број убедљивији код пацијената са х ИТП. Занимљиво да је у свакој групи регистровано од 25-30% пацијената који имају позитивна аутоантитела доступна дијагностици, без јасно испољене аутоимуне болести (Графикон 5.).

Графикон 5. Учесталост других аутоимуних болести код деце оболеле од ИТП



Увидом у породичну анамнезу, у скоро подједнаком проценту (око 30%) у породицама деце са ИТП у свим групама или нема никаквих познатих аутоимуних болести или их има више чланова домаћинства, а појединачни су случајеви са метаболичким болестима и болестима штитасте жлезде (Табела 2.).

Породична анамнеза	нд ИТП		п ИТП		х ИТП	
	N	%	N	%	N	%
ИТП у породици	0	0	1	4,5	3	10,3
Болести штитасте жлезде	2	7,4	2	9,0	4	13,8
Кожне болести	0	0	1	4,5	1	3,4
Метаболичке болести	6	22,2	3	13,6	5	17,3
Негативна породична анамнеза	10	37,0	7	31,8	8	27,6
Више чланова са аутоимуним болестима	9	33,4	8	36,6	8	27,6

N – number

Сви испитани пацијенти су имали параметре из скрининга хемостазе у референтним вредностима, свима су параметри функције јетре и бубрега били у границама нормале и сви су имали вредности подкласа имуноглобулина такође у референтним вредностима у складу са узрастом.

Нити један пацијент у нд ИТП и п ИТП није имао позитиван антиген на *Helicobacter pylori* из столице, али зато нешто више од 20% пацијената (6/29) из х ИТП групе је у неком тренутку имало позитиван тест. Троје од ових пацијената је имало и дигастричне сметње, и код њих је урађена и езофагогастроуденоскопија, са дефинитивном потврдом уреaza тестом и ПХ верификацијом. Код једног пацијента је у свакој следећој контроли тест био негативан, па није спроведена ерадикациона терапија, док је осталих 5 било на четворострукој терапији по протоколу у трајању месец дана. Занимљиво је да су сви ови пацијенти дечаци, са асимптоматском (4/6) и благом клиничком сликом (2/6) и са бројем тромбоцита $>50 \times 10^9/L$.

На Табели 3. је приказана учесталост хиповитаминозе Д и повишених вредности лактичне дехидрогеназе (ЛДХ) код деце оболеле од ИТП. Примећено је да око 65–75% деце у свим групама са ИТП има хиповитаминозу Д, од тога инсуфицијенцију витамина Д има 15% деце са нд ИТП, док је тај број у п ИТП и х ИТП до 25%. Екстремно високе

вредности ЛДХ преко 750 U/L су карактеристика деце са нд ИТП (40%), а још половина њих има повишене вредности преко 450 U/L. Са друге стране, код пацијената са п ИТП у 65% и код пацијената са х ИТП у 40% вредности ЛДХ су у границама нормалних.

Табела 3. Вредности лактичне дехидрогеназе и витамина Д код деце оболеле од ИТП	нд ИТП		п ИТП		х ИТП	
	N	%	N	%	N	%
Витамин Д (ng/mL)						
30-40	6	22,2	4	18,2	4	13,8
20-30	3	11,2	2	9,1	4	13,8
10-20	12	44,4	13	59,1	14	48,3
<10	6	22,2	3	13,6	7	24,1
Лактична дехидрогеназа (U/L)						
<450	3	11,2	14	63,6	12	41,4
450-750	13	48,1	8	36,4	15	51,7
>750	11	40,7	0	0	2	6,9

N – number

Ни код једног пацијента са нд ИТП није уочена хепатоспленомегалија. Са друге стране, ехосонграфским прегледом абдомена код скоро четвртине пацијената (5/22 у п ИТП и 8/29 у х ИТП групи) је у неком тренутку током праћења верификована спленомегалија, али је на тесту кинетике тромбоцита тај број био мањи, само 4 испитаника у х ИТП групи. Такође, било ултразвучно, током извођења теста кинетике или приликом спленектомије, код 17% испитаника (5/29) са х ИТП је уочена акцесорна слезина, док у осталим групама није верификована.

Средња вредност броја тромбоцита у време дијагностиковања болести, у групи са нд ИТП је била $14,7 \pm 3,6 \times 10^9/L$, знатно више вредности су регистроване код п ИТП $36,4 \pm 7,8 \times 10^9/L$, и код х ИТП $39,8 \pm 9,1 \times 10^9/L$. То је и очекивано јер скоро 70% пацијената са нд ИТП је имало број тромбоцита $<20 \times 10^9/L$, док је тај број значајно мањи код пацијената са п ИТП и х ИТП, свега око 20-25% пацијената, када не рачунамо клинички релапс болести.

Са друге стране, у групи са нд ИТП је регистрована највећа средња вредност волумена тромбоцита (*Mean platelet volume – MPV*) од $11,2 \pm 1,4 fL$, док је волумен тромбоцита значајно мањи код пацијената са дужим трајањем болести, $10,3 \pm 1,9 fL$ у п ИТП и $10,4 \pm 1,7 fL$ у х ИТП групи. Код све деце са ИТП је урађен цитолошки преглед аспириата костне сржи и ни у једној нису пронађене диспластичне промене, али је зато добијен занимљив резултат да од 20-25% пацијената у све три групе са ИТП имало ретке мегакариоците у косној сржи, за разлику од осталих који су имали очекивано нормалну костну срж или хиперпродукцију мегакариоцита (Табела 4.).

Табела 4. Број тромбоцита, средњи волумен тромбоцита и проценат мегакариоцита код деце оболеле од ИТП	нд ИТП		п ИТП		х ИТП	
	N	%	N	%	N	%
Број тромбоцита ($\times 10^9/L$)						
>50	2	7,4	10	45,4	9	31,1
20-50	6	22,2	8	36,4	13	44,8
10-20	9	33,3	2	9,1	5	17,2
<10	10	37,1	2	9,1	2	6,9
Средњи волумен тромбоцита (fL)						
7-10	6	22,2	8	36,4	10	34,5
10-12	10	37,1	14	63,6	15	51,7
>12	11	40,7	0	0	4	13,8
Процент мегакариоцита						
Хиперпродукција	15	55,5	14	63,6	16	55,2
Нормални	5	18,5	3	13,6	7	24,1
Ретки	7	26,0	5	22,8	6	20,7

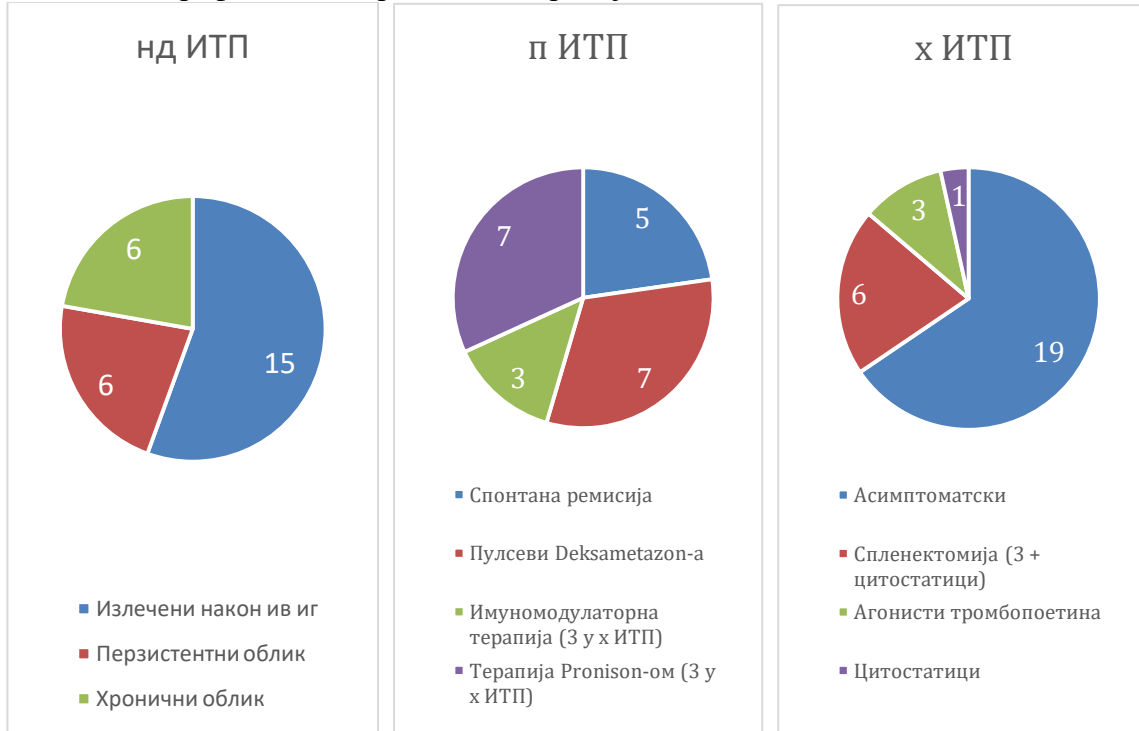
N – number

Од 27 деце са новооткривеном ИТП која су праћена најмање годину дана, више од половине (15/27) је постигло потпуну клиничку и лабораторијску ремисију након терапије ив имуноглобулинима, код осталих се јавио углавном лабораторијски рецидив болести, због чега је покушано са *watch and wait* приступом, а затим при преласку у перзистентни облик, и са терапијом системским кортикостероидима – *Pronison*-ом (код 7/22 п ИТП пацијента). Од тих пацијената код којих је болест трајала дуже од 3 месеца, око 20% (6/27) је у хроничној фази болести.

Код пацијената са п ИТП око 30% је доживело спонтану ремисију, а они који су захтевали примену терапије, поред пацијената лечених *Pronison*-ом, код 30% (7/22) су примењене пулсне дозе *Deksametazon*-а, а код троје је због неуспеха системске кортикостероидне терапије, покушано и са имуномодулаторном терапијом *Mycophenolat morphetil*-ом. Код сва три пацијента на имуномодулаторној терапији, као и код 3 пацијента који су били само на терапији *Pronison*-ом, болест је прогресирала ка хроничном облику. Пацијенти на пулсним дозама *Deksametazon*-а и преосталих 4 на терапији *Pronison*-ом су у комплетној ремисији.

Око 35% пацијената са х ИТП (10/29) је захтевало употребу терапије, 3 пацијента су спленектомисана, уз комплетну ремисију, 3 пацијента су на терапији агонистима тромбопоетинских рецептора, уз клиничку ремисију, код 4 пацијента је поред остале терапије покушано и са различитим протоколима цитостатицима, 3 од њих 4 је и спленектомисано, без успеха (Графикони 6.).

Графикони 6. Примењена терапија код деце оболеле од ИТП



Код пацијената са нд ИТП је установљено да сви пацијенти који су излечени након примене ив имуноглобулина нису имали придружених болести, изузев ИТП и да скоро 70% њих има негативну породичну анамнезу у смислу аутоимуних болести. Са друге стране, пацијенти који су током праћења прешли у хронични облик болести су без изузетка имали других аутоимуних болести, поред ИТП и позитивну породичну анамнезу. Излечени пацијенти углавном прате један истоветни образац, број тромбоцита $<20 \times 10^9/L$, средњи волумен тромбоцита $>10 fL$ и хиперпродукција мегакариоцита у костној сржи, док је 60% њих имало средње тешка или тешка крварења при постављању дијагнозе. Насупрот томе, пацијенти чија је болест прогресирала ка хроничитету су имали већи број тромбоцита $>20 \times 10^9/L$, који су углавном нормалне величине и са нормалним или ретким мегакариоцитима у костној сржи и равномерном расподелом крварећих и асимптоматских пацијената. Вредности витамина Д и лактичне дехидрогеназе немају ефекта на терапијски исход код пацијената са нд ИТП (Табела 5.).

Табела 5. Утицај клиничких и лабораторијских параметара на успех терапије код деце са нд ИТП	Исход лечења деце са нд ИТП					
	Излечени након ив иг (N=15)		Перзистентни облик (N=6)		Хронични облик (N=6)	
Присуство других болести *	N	%	N	%	N	%
Да	0	0	3	50	5	83,3
Не	15	100	3	50	1	16,7
Болести у породици *	N	%	N	%	N	%
Да	5	33,3	6	100	6	100
Не	10	66,7	0	0	0	0
Bleeding severity score *	N	%	N	%	N	%
1 и 2	6	40	4	66,7	3	50
3 и 4	9	60	2	33,3	3	50
Број тромбоцита *	N	%	N	%	N	%
<20×10 ⁹ /L	15	100	4	66,7	0	0
20–50×10 ⁹ /L	0	0	2	33,3	4	66,7
>50×10 ⁹ /L	0	0	0	0	2	33,3
MPV (fL) *	N	%	N	%	N	%
7–10	0	0	2	33,3	4	66,7
10–12	4	26,7	4	66,7	2	33,3
>12	11	73,3	0	0	0	0
Процент мегакариоцита *	N	%	N	%	N	%
Ретки Мкц	0	0	3	50	4	66,7
Нормални Мкц	1	6,7	2	33,3	2	33,3
Хиперпродукција Мкц	14	93,3	1	16,7	0	0
Витамин Д (ng/mL) #	N	%	N	%	N	%
<20	10	66,7	4	66,7	4	66,7
>20	5	33,3	2	33,3	2	33,3
ЛДХ (U/L) #	N	%	N	%	N	%
<450	1	6,7	1	16,7	1	16,7
>450	14	93,3	5	83,3	5	83,3

* p<0,05; # p>0,05; N – number; иг – имуноглобулини;

Код пацијената са п ИТП доказано је они пацијенти који су захтевали терапију системским кортикостероидима су у скоро 80% без присуства других аутоimunих болести, али зато преко 70% има позитивну породичну анамнезу и углавном су са благим знацима хеморагијског синдрома. Такође, скоро 85% њих је имало задовољавајући број тромбоцита >20×10⁹/L, од чега 50% број тромбоцита >50×10⁹/L, исти проценат је имао средњи волумен тромбоцита лако повећан и око 80% је имало хиперпродукцију мегакариоцита у костној сржи, док са другим параметрима не постоје тако јасне корелације (Табела 6.).

Табела 6. Утицај клиничких и лабораторијских параметара на успех терапије код деце са п ИТП	Исход лечења деце са п ИТП					
	Спонтана ремисија (N=5)		Терапија кортикостероидима (N=14)		Имуномодулаторна терапија (N=3)	
Присуство других болести *	N	%	N	%	N	%
Да	3	60	3	21,4	3	100
Не	2	40	11	78,6	0	0
Болести у породици *	N	%	N	%	N	%
Да	2	40	10	71,4	3	100
Не	3	60	4	28,6	0	0
Bleeding severity score *	N	%	N	%	N	%
1 и 2	5	100	12	85,7	1	33,3
3 и 4	0	0	2	14,3	2	66,7
Број тромбоцита #	N	%	N	%	N	%
<20×10 ⁹ /L	0	0	2	14,3	2	66,7
20–50×10 ⁹ /L	3	60	4	28,6	1	33,3
>50×10 ⁹ /L	2	40	8	57,1	0	0
MPV (fL) *	N	%	N	%	N	%
7–10	3	60	2	14,3	3	100
10–12	2	40	12	85,7	0	0
>12	0	0	0	0	0	0
Процент мегакариоцита *	N	%	N	%	N	%
Ретки Мкц	0	0	3	21,4	2	66,7
Нормални Мкц	2	40	0	0	1	33,3
Хиперпродукција Мкц	3	60	11	78,6	0	0
Витамин Д (ng/mL) #	N	%	N	%	N	%
<20	3	60	10	71,4	3	100
>20	2	40	4	28,6	0	0
ЛДХ (U/L) #	N	%	N	%	N	%
<450	3	60	10	71,4	1	33,3
>450	2	40	4	28,6	2	66,7

* p<0,05; # p>0,05; N – number

Добијени су занимљиви резултати када су у питању пацијенти са х ИТП, јер без обзира да ли су асимптоматски или су због озбиљних знакова хеморагијског синдрома морали да примају терапију друге или треће линије, није добијена корелација ни са једним клиничким и лабораторијским параметром, изузев што сви пацијенти са х ИТП који су захтевали лечење без изузетка имају рођаке са аутоимуним болестима (Табела 7.).

Табела 7. Утицај клиничких и лабораторијских параметара на успех терапије код деце са х ИТП	Исход лечења деце са х ИТП					
	Асимптоматски (N=19)		Спленектомија + цитостатици (N=7)		Агонисти тромбопоетина (N=3)	
Присуство других болести #	N	%	N	%	N	%
Да	11	57,9	4	57,2	2	66,7
Не	8	42,1	3	42,8	1	33,3
Болести у породици *	N	%	N	%	N	%
Да	11	57,9	7	100	3	100
Не	8	42,1	0	0	0	0
<i>Bleeding severity score</i> *	N	%	N	%	N	%
1 и 2	19	100	3	42,8	1	33,3
3 и 4	0	0	4	57,2	2	66,7
Број тромбоцита #	N	%	N	%	N	%
<20×10 ⁹ /L	3	15,8	2	28,6	2	66,7
20–50×10 ⁹ /L	9	47,4	3	42,8	1	33,3
>50×10 ⁹ /L	7	36,8	2	28,6	0	0
MPV (fL) #	N	%	N	%	N	%
7–10	7	36,8	2	71,4	1	33,3
10–12	10	52,6	4	28,6	1	33,3
>12	2	10,6	1	0	1	33,3
Процент мегакариоцита #	N	%	N	%	N	%
Ретки Мкц	2	10,6	2	28,6	2	66,7
Нормални Мкц	4	21	2	28,6	1	33,3
Хиперпродукција Мкц	13	68,4	3	42,8	0	0
Витамин Д (ng/mL) #	N	%	N	%	N	%
<20	5	26,3	2	28,6	1	33,3
>20	14	73,7	5	71,4	2	66,7
ЛДХ (U/L) #	N	%	N	%	N	%
<450	9	42,1	3	42,8	1	33,3
>450	11	57,9	4	57,2	2	66,7

* p<0,05; # p>0,05; N – number

Када говоримо о тесту кинетике тромбоцита, он је урађен код свих пацијената са хроничном болешћу. Средњи животни век тромбоцита у нашој испитиваној групи је био $0,94 \pm 0,47$ дана (око 22h). Упадљиво је да највећи број пацијената (скоро 70%) са х ИТП има средњи век тромбоцита краћи од једног дана, али са друге стране, 15% пацијената је имао скоро нормалан животни век тромбоцита. 35% пацијената је имао нормалан, такође и 35% јако низак степен продукције тромбоцита у костној сржи. Код скоро 60% пацијената се слезина презентује као доминантни или једини орган секвестрације тромбоцита, а код 30% постоји мешовита секвестрација у јетри и слезини. Код 10% слезина није уопште укључена у процес секвестрације тромбоцита (Табела 8.).

Табела 8. Приказ параметара из теста кинетике тромбоцита код деце са х ИТП

Средњи век тромбоцита (дани)	<0,5	0,5–1	1–1,5	1,5–4	>4
N	6	13	5	2	3
%	20,7	44,7	17,2	6,9	10,3
Индекс продукције	<0,5	0,5–1	1–1,5	1,5–2	>2
N	5	6	7	6	5
%	17,2	20,7	24,3	20,7	17,2
Место (индекс) секвестрације	Јетра + други органи	Мешовито (јетра + слезина)	Предоминантно слезина	Слезина	
N	3	9	3	14	
%	10,3	31,1	10,3	48,3	

N – number

4.2. Параметри ОС и ADS у различитим групама деце оболеле од ИТП

Поредећи групе деце са ИТП, убедљиво највише средње вредности супероксид анјон радикала (O_2^-) и индекса липидне пероксидације (TBARS) забележене су код пацијената са новооткривеном ИТП у време постављања дијагнозе, док је вредност азот монооксида (NO) најнижа у овој групи. За водоник пероксид (H_2O_2) не постоји значајна разлика међу групама, док је блага хиперхомоцистеинија (HCY) регистрована само код х ИТП, а у остале две групе са ИТП је на горњој граници нормале. Сви испитивани параметри оксидационог стреса, изузев NO, су значајно виши код пацијената са ИТП него у контролним групама (Табела 9.).

Табела 9. Средње вредности параметара оксидационог стреса у испитиваним групама	O_2^- (nmol/mL)	TBARS (μ mol/mL)	H_2O_2 (μ mol/mL)	NO (μ mol/L)	HCY (μ mol/L)
	СВ ± СД	СВ ± СД	СВ ± СД	СВ ± СД	СВ ± СД
нд ИТП	7,02 ± 2,65	3,23 ± 0,65	2,85 ± 0,22	2,43 ± 0,38	9,82 ± 3,95
п ИТП	2,47 ± 0,57	1,83 ± 0,31	2,86 ± 0,28	3,01 ± 0,44	9,49 ± 3,05
х ИТП	2,45 ± 0,48	1,78 ± 0,21	2,94 ± 0,19	3,08 ± 0,48	12,08 ± 2,36
Здрава деца	0,77 ± 0,09	0,56 ± 0,03	1,32 ± 0,07	4,58 ± 0,21	4,27 ± 0,83
и ИТП	0,81 ± 0,11	0,62 ± 0,04	1,28 ± 0,06	4,77 ± 0,27	5,12 ± 1,12
р вредност	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

СВ – средња вредност, СД – стандардна девијација

Слично томе, убедљиво највише средње вредности тромбоксана А2 (TxA2), асиметричног диметил аргинина (АДМА) и оксидованог LDL (oxLDL) забележене су код пацијената са новооткривеном ИТП у време постављања дијагнозе и знатно су веће него у контролним групама, док су вредности простаглицина (Pgl2) и аргинина (Arg) најниже у нд ИТП групи и значајно ниже него у контролним групама (Табела 10.).

Табела 10. Средње вредности параметара оксидационог стреса у испитиваним групама	<i>TxA2</i> ($\mu\text{g/mL}$)	АДМА (μM)	<i>oxLDL</i> (mmol/L)	<i>PgI2</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Арг (μM)
	СВ \pm СД	СВ \pm СД	СВ \pm СД	СВ \pm СД	СВ \pm СД
нд ИТП	2,5 \pm 0,45	10,67 \pm 2,72	5,44 \pm 0,72	1,93 \pm 0,24	2,51 \pm 0,87
п ИТП	1,75 \pm 0,35	6,85 \pm 1,97	3,68 \pm 0,67	3,13 \pm 0,57	6,46 \pm 1,23
х ИТП	1,76 \pm 0,25	6,93 \pm 1,83	3,78 \pm 0,79	3,16 \pm 0,46	6,28 \pm 1,58
Здрава деца	0,85 \pm 0,15	1,03 \pm 0,28	1,72 \pm 0,17	4,27 \pm 0,29	8,23 \pm 0,81
и ИТП	0,90 \pm 0,10	0,99 \pm 0,21	1,68 \pm 0,16	4,19 \pm 0,23	8,12 \pm 0,72
р вредност	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

СВ – средња вредност, СД – стандардна девијација

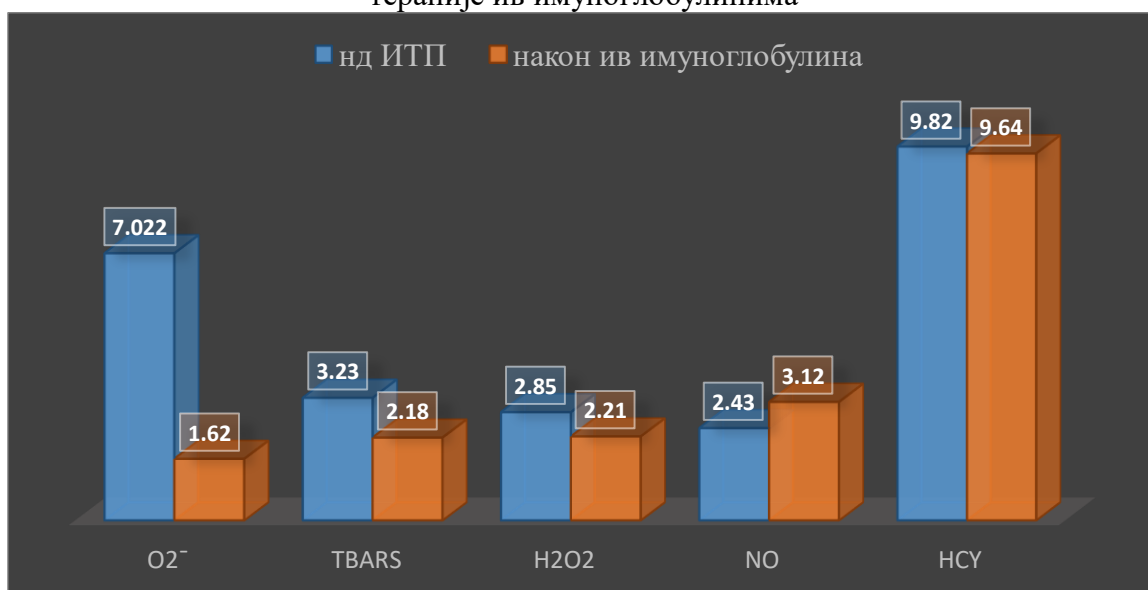
Када говоримо о параметрима антиоксидационе заштите, редуковани глутатион (*GSH*) и каталаза (КАТ) су статистички значајно виши у контролним групама него код пацијената са ИТП, док је супероксид дизмутаза (*SOD*) највиша код пацијената са новооткривеном ИТП, док у осталим групама нема неке велике разлике. Поредићи групе деце оболеле од ИТП, за *GSH* такође не постоји тако изражена разлика међу групама, али је КАТ опет највиша код пацијената са новооткривеном ИТП (Табела 11.).

Табела 11. Средње вредности параметара антиоксидационе заштите у испитиваним групама	<i>GSH</i> ($\text{U/g Hg} \times 10^3$)	<i>SOD</i> ($\text{U/g Hg} \times 10^3$)	КАТ ($\text{U/g Hg} \times 10^3$)
	СВ \pm СД	СВ \pm СД	СВ \pm СД
нд ИТП	73,381 \pm 2,365	29,91 \pm 13,75	3,65 \pm 1,75
п ИТП	72,259 \pm 2,128	10,28 \pm 1,64	1,15 \pm 0,35
х ИТП	72,081 \pm 2,075	10,74 \pm 1,32	0,45 \pm 0,10
Здрава деца	79,918 \pm 1,349	11,54 \pm 1,03	13,55 \pm 2,25
и ИТП	80,023 \pm 1,227	11,68 \pm 1,24	9,85 \pm 1,65
р вредност	<0,05	>0,05	<0,05

СВ – средња вредност, СД – стандардна девијација

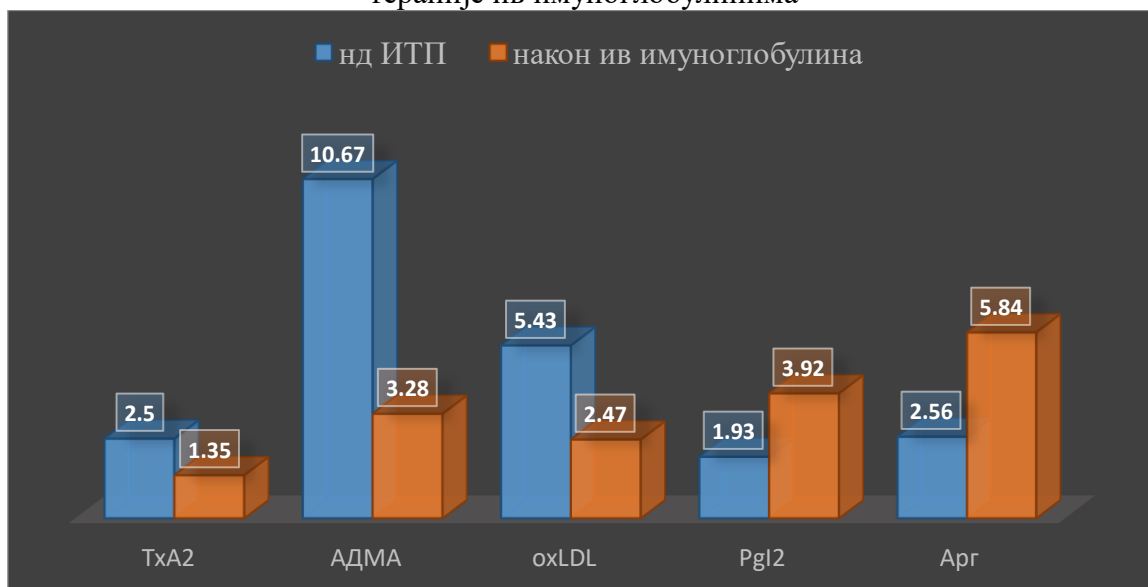
Поредићи параметре оксидационог стреса код деце са новооткривеном ИТП пре и након терапије ив имуноглобулинима установљено је да вредности O_2^- , *TBARS* и H_2O_2 значајно падају након терапије, *NO* значајно расте, док на вредност *HCY* терапија нема неког утицаја (Графикон 7.).

Графикон 7. Параметри оксидационог стреса код деце оболеле од нд ИТП пре и након терапије ив имуноглобулина



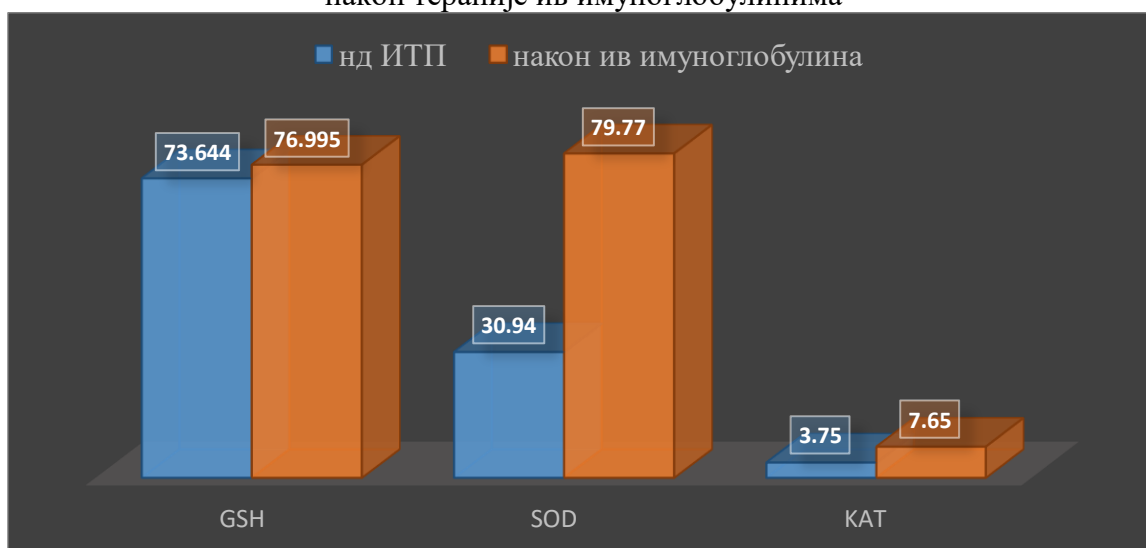
По истом принципу се дешавају промене и код осталих параметара оксидационог стреса након примене ив имуноглобулина код нд ИТП, па је тако установљено да вредности *TxA2*, АДМА и *oxLDL* значајно падају након терапије, а вредности *PgI2* и Арг значајно расту (Графикон 8.).

Графикон 8. Параметри оксидационог стреса код деце оболеле од нд ИТП пре и након терапије ив имуноглобулина



Од параметара антиоксидационе заштите, након терапије ив имуноглобулина код нд ИТП долази до више од двоструког пораста вредности *SOD* и *KAT*, док повећање *GSH* није толико евидентно (Графикон 9.).

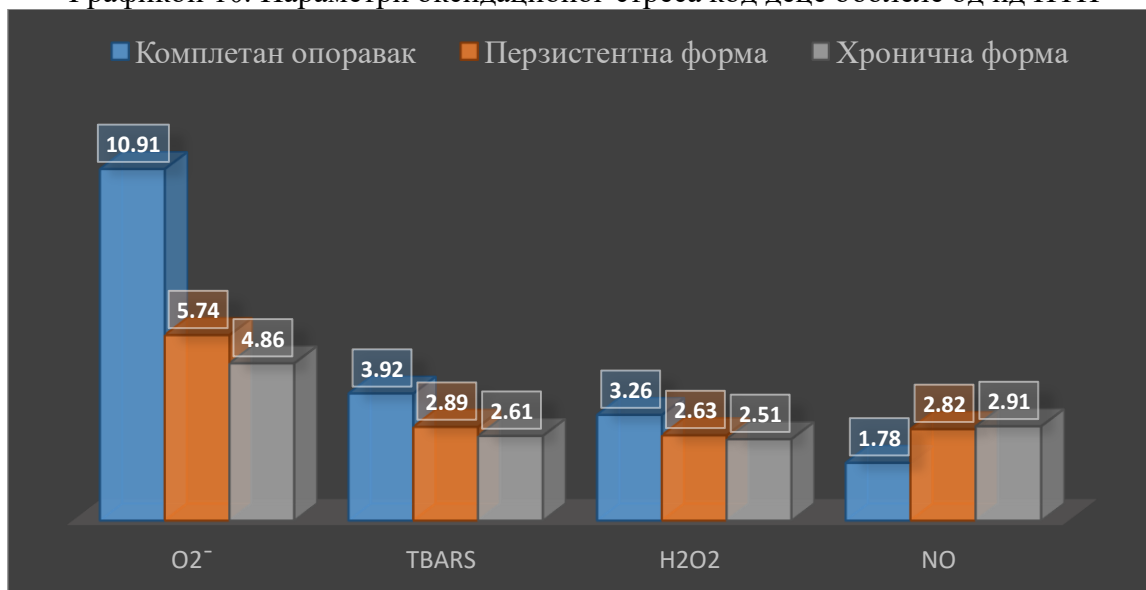
Графикон 9. Параметри антиоксидационе заштите код деце оболеле од нд ИТП пре и након терапије ив имуноглобулина



Од 27 деце са новооткривеном ИТП која су праћена најмање годину дана, више од половине (15/27) је доживело потпуну клиничку и лабораторијску ремисију након терапије ив имуноглобулина, код осталих се јавио углавном лабораторијски рецидив болести, због чега је покушано са терапијом системским кортикостероидима или имуномодулаторима. Од тих пацијената код којих је болест трајала дуже од 3 месеца, око 20% (6/27) је у хроничној фази болести.

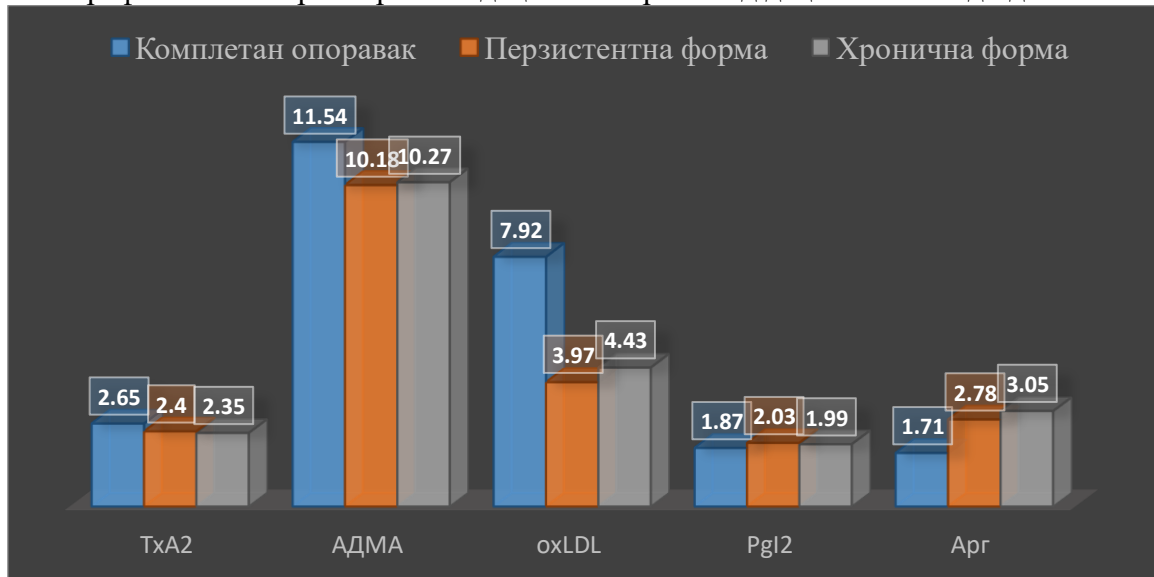
Регистровано је да су вредности O_2^- најизраженије у групи нд ИТП који су имали комплетан опоравак после терапије. Знатно мања разлика је примећена када су у питању вредности TBARS и H_2O_2 , док је NO поново најнижи код пацијената који су имали комплетан опоравак у односу на друге две групе (Графикон 10.). Вредности хомоцистеина се статистички не разликују значајно међу пацијентима са нд ИТП.

Графикон 10. Параметри оксидационог стреса код деце оболеле од нд ИТП



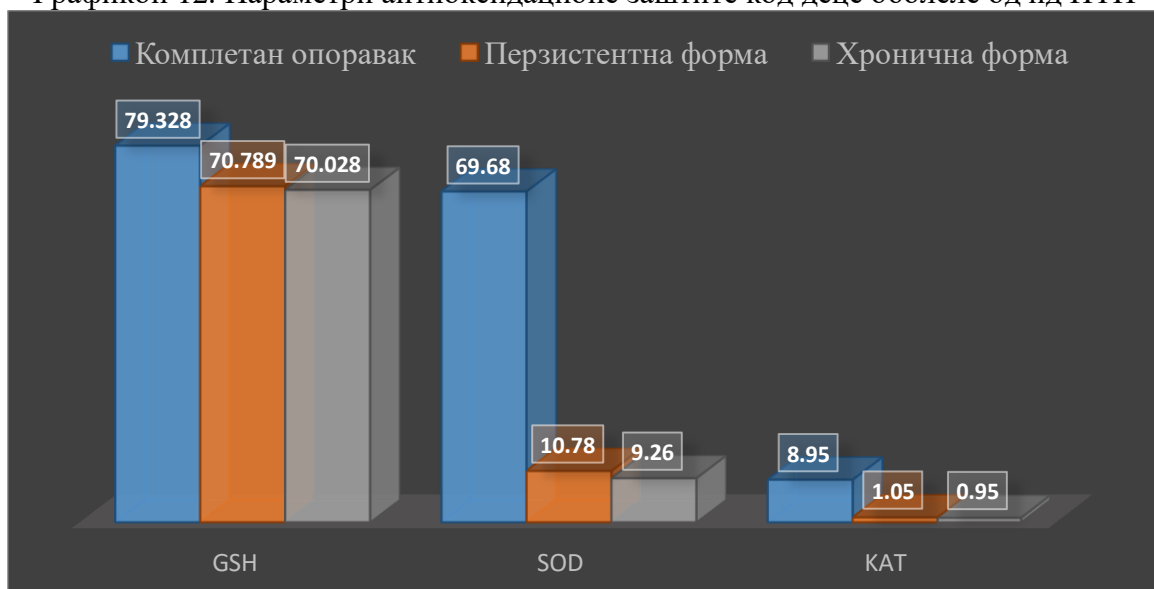
Од осталих параметара оксидационог стреса најупадљивије разлике између оних нд ИТП пацијената који су доживели комплетну ремисију у односу на оне који су прогредирали ка хроничном облику су регистроване у вредностима *oxLDL* у смислу највећих вредности и *Arg* у смислу најнижих вредности у групи са комплетном ремисијом након лечења, док за остале параметре није установљена тако јасна корелација (Графикон 11.).

Графикон 11. Параметри оксидационог стреса код деце оболеле од нд ИТП



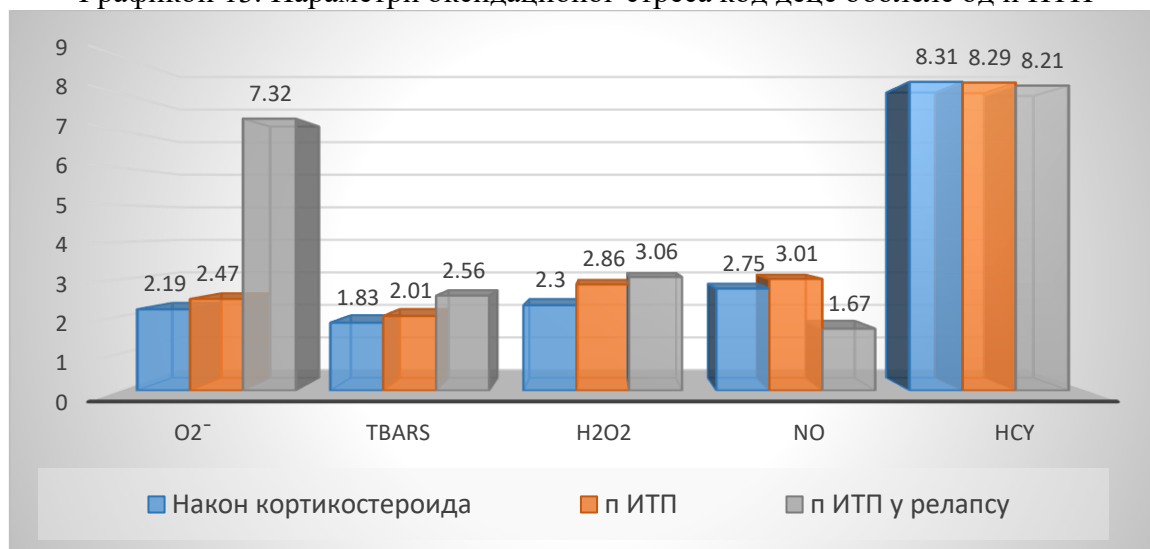
Пацијенти који су имали комплетан опоравак имају статистички значајно више вредности свих мерених параметара антиоксидационе заштите, а та разлика је најупадљивија када су у питању вредности *SOD* (Графикон 12.).

Графикон 12. Параметри антиоксидационе заштите код деце оболеле од нд ИТП



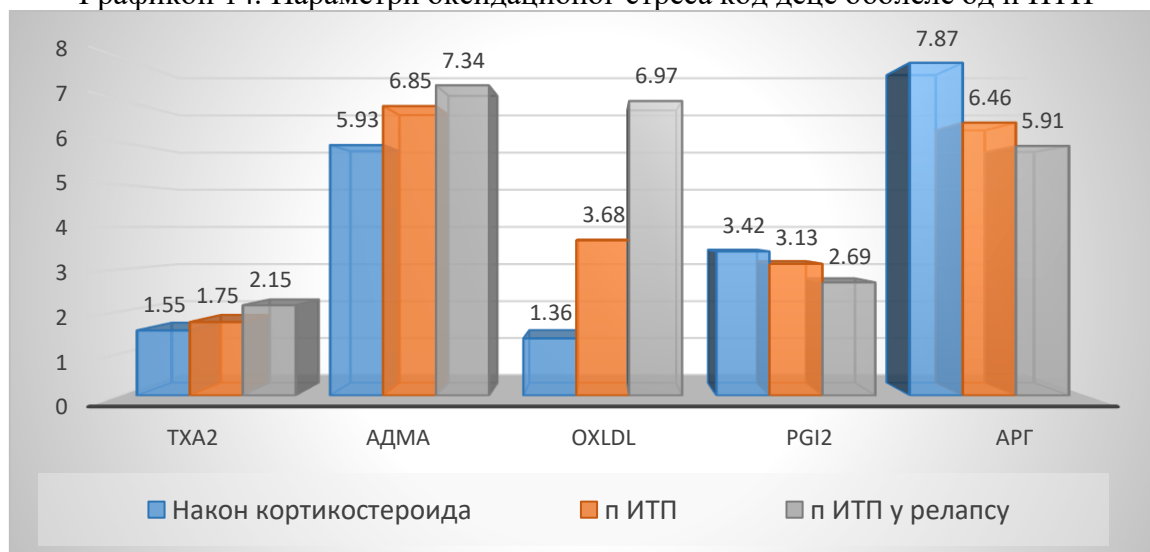
Пацијенти са перзистентним обликом који су укључени у истраживање, по завршеној терапији неким од протокола системским кортикостероидима, су имали ниже вредности свих испитиваних параметара ОС, али то снижење није тако евидентно као након ив имуноглобулина у нд ИТП. Од 22 пацијента са перзистентним обликом, током праћења око 35% (8/22) је доживело рецидив болести и захтевало поновну употребу терапије. Као и у случају нд ИТП, O_2^- као повишен и NO као снижен, се доминантно издвајају међу овим групама, док као и у првом примеру, вредности хомоцистеина се најмање разликују међу групама (Графикон 13.).

Графикон 13. Параметри оксидационог стреса код деце оболеле од п ИТП



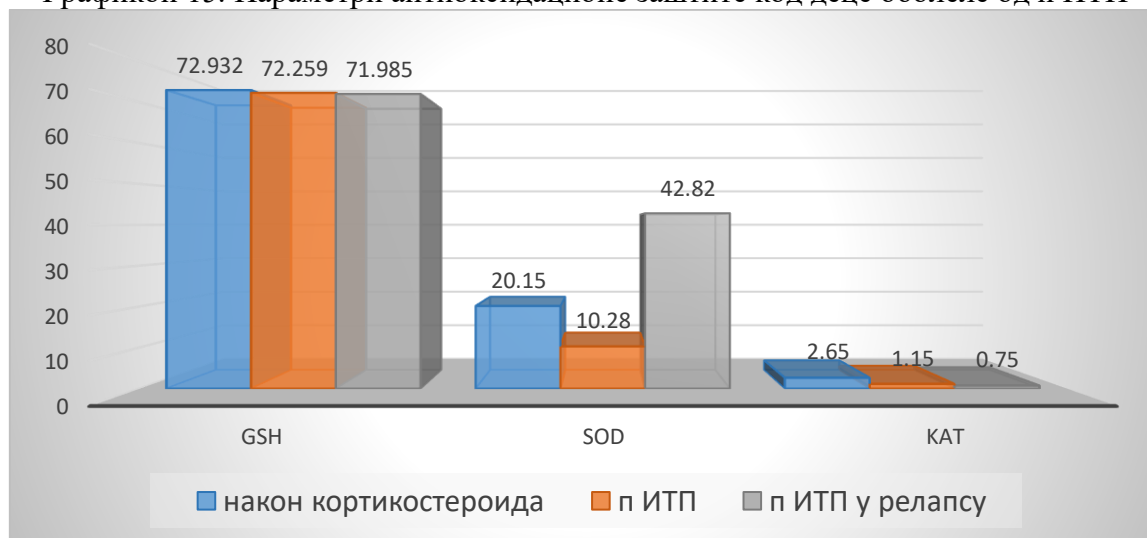
И код осталих параметара оксидационог стреса након примене кортикостероидне терапије се дешавају сличне промене, али поново мање изражене него након примене ив имуноглобулина код нд ИТП, па тако вредности TxA_2 и $oxLDL$ значајно падају након терапије, а вредности PgI_2 и Arg значајно расту, док у п ИТП терапија нема великог утицаја на вредности АДМА. Са друге стране, најупадљивије разлике у релапсу примећене су једино у вредностима $oxLDL$, док за остале параметре није установљена тако јака разлика (Графикон 14.).

Графикон 14. Параметри оксидационог стреса код деце оболеле од п ИТП



Када говоримо о параметрима антиоксидационе заштите, код пацијенти са перзистентним обликом након примене системске кортикостероидне терапије добијене су више вредности *SOD* и *KAT*, а рецидив болести је довео до значајно повишених вредности *SOD*, а значајно снижених *KAT*, док у све три групе вредности *GSH* не показују статистички значајну разлику (Графикон 15.).

Графикон 15. Параметри антиоксидационе заштите код деце оболеле од п ИТП



Приликом поређења како различите врсте системске кортикостероидне терапије делују на параметре ОС и *ADS* добијено је да пулсне дозе *Deksametazon*-а имају бољи ефекат на смањење ОС од терапије *Pronison*-ом, али зато скоро подједнако имају утицаја на опоравак *ADS* (Табела 12.).

Табела 12. Утицај различитих протокола системске кортикостероидне терапије на средње вредности ОС и <i>ADS</i> код деце са п ИТП	Системски кортикостероиди		
	п ИТП	<i>Deksametazon</i>	<i>Pronison</i>
O_2^- (nmol/mL) *	2,47	2,09	2,27
H_2O_2 (μ mol/mL) *	2,86	2,16	2,44
<i>TBARS</i> (μ mol/mL) *	2,01	1,77	1,89
<i>NO</i> (μ mol/mL) *	3,01	2,63	2,87
<i>HCY</i> (μ mol/mL) #	8,29	8,28	8,34
<i>TxA2</i> (μ g/mL) *	1,75	1,5	1,6
<i>ADMA</i> (μ M) *	6,85	5,69	6,17
<i>oxLDL</i> (mmol/L) *	3,68	1,07	1,65
<i>PgI2</i> (μ g/mL) *	3,13	3,51	3,33
<i>Arg</i> (μ M) *	6,46	8,06	7,68
<i>GSH</i> (U/g Hg $\times 10^3$) #	72,259	72,922	72,942
<i>SOD</i> (U/g Hg $\times 10^3$) #	10,28	19,95	20,35
<i>KAT</i> (U/g Hg $\times 10^3$) #	1,15	1,65	1,65

* p<0,05; # p>0,05;

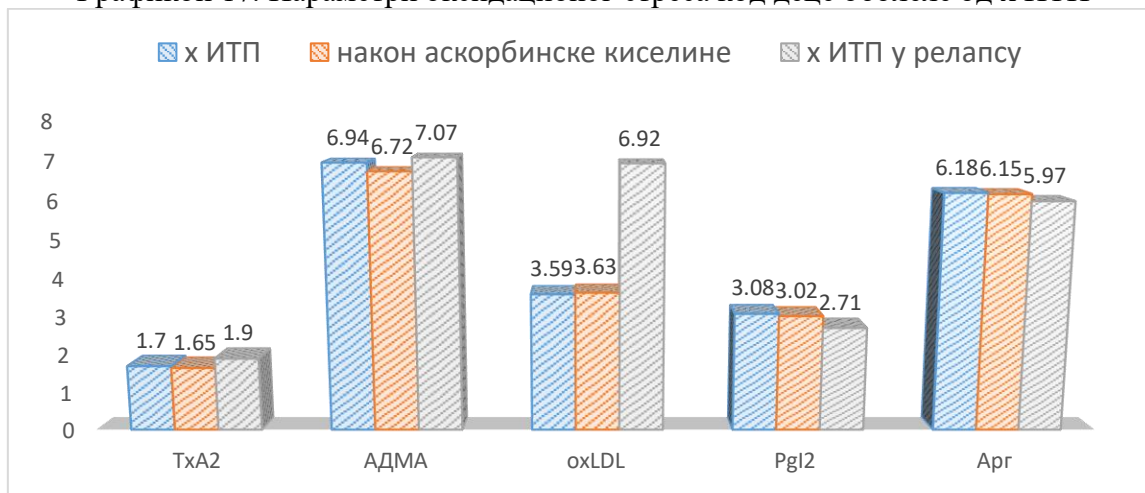
Нешто другачија ситуација је примећена код пацијената са хроничним обликом ИТП. Код свих параметара оксидационог стреса није пронађена статистички значајна разлика пре и после суплементације аскорбинском киселином, али се слично као у претходним примерима, у случају рецидива (који је доживело око 30% деце са х ИТП – 10/29) дешавају промене у смислу значајно повишених вредности O_2^- и *TBARS*, уз значајно смеђење *NO*, док се H_2O_2 и хомоцистеин не мењају значајно у рецидиву (Графикон 16.).

Графикон 16. Параметри оксидационог стреса код деце оболеле од х ИТП



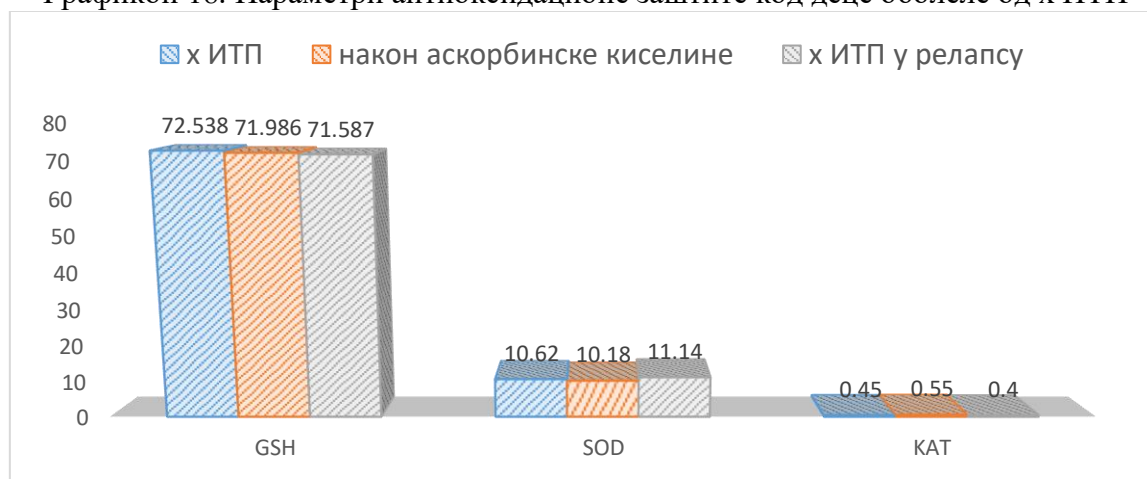
Није регистровано да употреба аскорбинске киселине утиче значајније ни на остале параметре ОС, а у рецидиву као и код п ИТП, једино се вредности *oxLDL* значајније повећавају, за разлику од осталих параметара, где није нађена таква разлика у средњим вредностима (Графикон 17.).

Графикон 17. Параметри оксидационог стреса код деце оболеле од х ИТП



Занимљиво је да није регистровано ни да употреба аскорбинске киселине подиже нивое антиоксидационе заштите код пацијената са х ИТП. Са друге стране, за разлику од пацијената са нд и п ИТП, у рецидиву х ИТП такође не долази до значајнијих промена у антиоксидационој заштити код свих испитиваних параметара (Графикон 18.).

Графикон 18. Параметри антиоксидационе заштите код деце оболеле од х ИТП



4.3. Корелација параметара ОС / ADS са различитим клиничким и лабораторијским параметрима код деце оболеле од ИТП

Није запажена статистички значајна разлика у параметрима ОС и ADS код пацијената са ИТП у свим групама када се узме у разматрање полна и узрасна подела.

Са друге стране, највише средње вредности O_2^- , H_2O_2 , TBARS, АДМА и *oxLDL*, а најниже *NO*, *PgI2* и Арг су забележене код пацијената са тежом клиничком сликом (већим BSS). Међутим, од параметара антиоксидационе заштите, само вредности SOD корелирају са тежином клиничке слике, тј. степеном крварења, док код осталих параметара нису пронађене значајније разлике. Ради лакшег приказа, на Табели 13. представљене су средње вредности параметара ОС и ADS свих пацијената са ИТП збирно према степену крварења.

Табела 13. Средње вредности ОС и ADS према степену крварења код деце са ИТП	Степен крварења			
	BSS 1	BSS 2	BSS 3	BSS 4
O_2^- (nmol/mL) *	1,79	2,74	4,98	5,82
H_2O_2 (μ mol/mL) *	2,15	2,65	3,14	3,42
TBARS (μ mol/mL) *	1,35	1,67	3,09	3,17
<i>NO</i> (μ mol/mL) *	3,31	3,14	2,42	1,94
<i>HCY</i> (μ mol/mL) #	10,38	10,47	10,51	10,44
<i>TxA2</i> (μ g/mL) *	1,55	1,85	2,15	2,45
АДМА (μ M) *	5,43	6,87	9,19	11,03
<i>oxLDL</i> (mmol/L) *	2,81	3,74	4,64	6,23
<i>PgI2</i> (μ g/mL) *	3,89	3,01	2,43	1,75
Арг (μ M) *	6,53	5,84	4,68	2,82
GSH (U/g Hg $\times 10^3$) #	72,254	72,187	72,928	73,129
SOD (U/g Hg $\times 10^3$) #	10,68	11,04	20,32	26,38
KAT (U/g Hg $\times 10^3$) #	1,65	1,85	1,75	1,75

* $p < 0,05$; # $p > 0,05$;

Поређећи параметре ОС код свих пацијената са ИТП збирно, установљено је да корелирају у обрнутој пропорцији са присуством других аутомуних болести, док само присуство аутоантитела делује најповољније на ове пацијенте. Најслабију ADS имају пацијенти са аутоимуни болестима, а најјачу они са присуством аутоантитела (Табела 14.).

Табела 14. Утицај присуства других аутоимуних болести на ОС и ADS код деце са ИТП	ИТП + аутоимуне болести	Само ИТП	ИТП + аутоантитела
O_2^- (nmol/mL) *	5,84	3,73	2,37
H_2O_2 (μ mol/mL) *	3,35	2,81	2,44
TBARS (μ mol/mL) *	3,08	2,23	1,71
NO (μ mol/mL) *	1,87	2,61	3,24
HCY (μ mol/mL) #	10,58	10,32	10,54
TxA2 (μ g/mL) *	2,35	2,05	1,7
АДМА (μ M) *	9,23	8,17	6,79
oxLDL (mmol/L) *	5,02	4,52	3,91
PgI2 (μ g/mL) *	2,18	2,89	3,23
Арг (μ M) *	3,46	5,39	6,18
GSH (U/g Hgx10 ³) *	69,763	72,229	74,654
SOD (U/g Hgx10 ³) *	22,36	17,32	10,42
КАТ (U/g Hgx10 ³) *	1,35	1,85	2,15

* p<0,05; # p>0,05;

Највише средње вредности параметара ОС су нађене код пацијената са ИТП који имају нижи број тромбоцита $<20 \times 10^9/L$, док се вредности HCY ни у овом случају не мењају значајно. Са друге стране, када говоримо о односу параметара ADS са различитим бројем тромбоцита, није установљена значајна разлика, изузев за вредности SOD (Табела 15.).

Табела 15. Утицај броја тромбоцита на ОС и ADS код деце са ИТП	Број тромбоцита		
	$<20 \times 10^9/L$	$20-50 \times 10^9/L$	$>50 \times 10^9/L$
O_2^- (nmol/mL) *	5,36	3,92	2,69
H_2O_2 (μ mol/mL) *	3,49	2,69	2,37
TBARS (μ mol/mL) *	3,35	1,99	1,47
NO (μ mol/mL) *	1,46	2,83	3,14
HCY (μ mol/mL) #	10,47	10,39	10,53
TxA2 (μ g/mL) *	2,35	2,05	1,6
АДМА (μ M) *	9,48	7,97	6,51
oxLDL (mmol/L) *	5,79	4,53	2,92
PgI2 (μ g/mL) *	2,13	2,87	3,31
Арг (μ M) *	3,72	5,19	6,17
GSH (U/g Hgx10 ³) #	72,985	72,125	72,012
SOD (U/g Hgx10 ³) *	24,28	15,26	10,48
КАТ (U/g Hgx10 ³) *	1,35	1,75	2,1

* p<0,05; # p>0,05;

Такође, никаква статистички значајна разлика није пронађена између средњих вредности параметара ОС и ADS са различитим волуменом тромбоцита.

Пацијенти са ИТП који имају хиперпродукцију мегакариоцита у цитолошком прегледу аспириата костне сржи имају значајно више вредности O_2^- , H_2O_2 , TBARS, TxA2, АДМА и oxLDL, као и SOD, а ниже NO, PgI2 и Арг у односу на пацијенте са нормалним бројем или ретким Мкц, док за остале параметре ADS и HCY није пронађена статистички значајна разлика (Табела 16.).

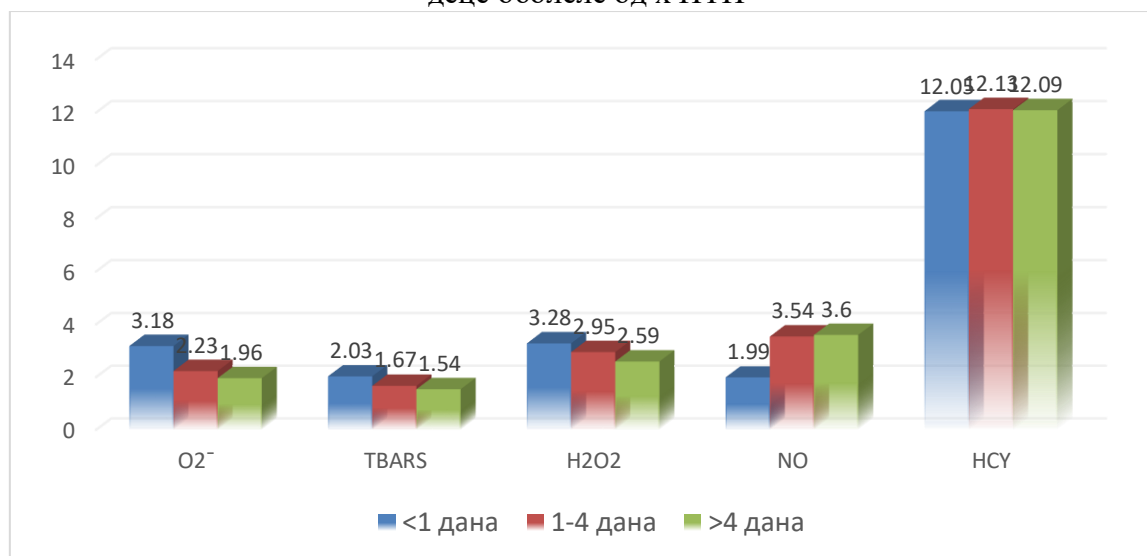
Табела 16. Утицај процента Мкц у костној сржи на ОС и ADS код деце са ИТП	Процент мегакариоцита у костној сржи		
	Ретки Мкц	Нормална продукција	Хиперпродукција Мкц
O_2^- (nmol/mL) *	2,84	3,79	5,32
H_2O_2 (μ mol/mL) *	2,72	2,84	3,17
TBARS (μ mol/mL) *	1,79	1,87	3,12
NO (μ mol/mL) *	3,01	2,82	1,96
HCY (μ mol/mL) #	10,41	10,53	10,38
TxA2 (μ g/mL) *	1,75	2,05	2,2
АДМА (μ M) *	7,23	7,44	9,06
oxLDL (mmol/L) *	3,69	4,31	4,93
PgI2 (μ g/mL) *	3,18	2,84	2,38
Арг (μ M) *	5,53	5,39	4,12
GSH (U/g Hgx10 ³) #	72,574	72,018	72,416
SOD (U/g Hgx10 ³) *	15,26	15,64	26,18
КАТ (U/g Hgx10 ³) #	1,45	1,8	1,9

* p<0,05; # p>0,05;

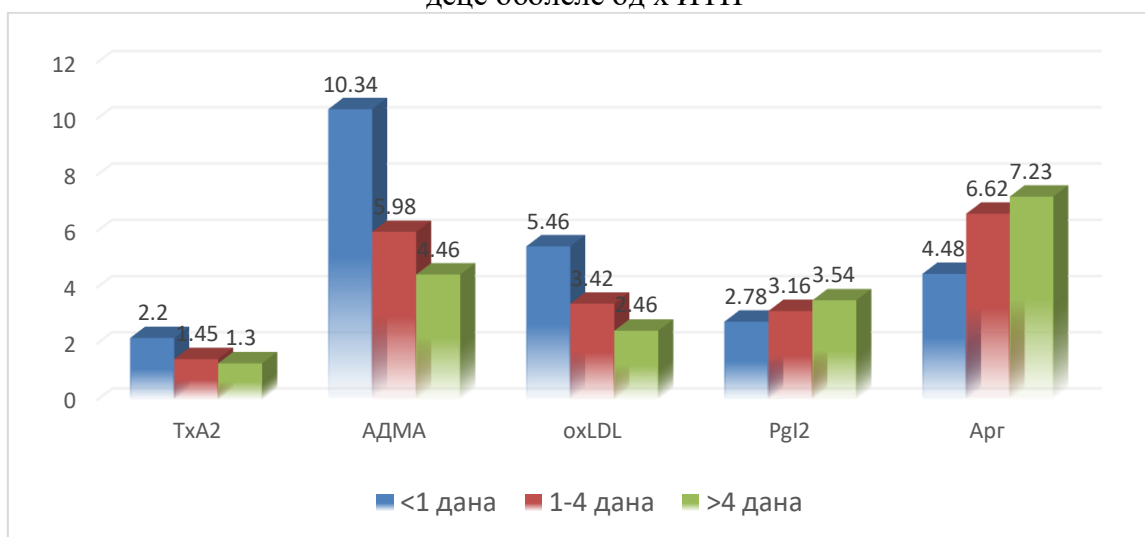
4.4. Корелација параметара ОС / ADS и параметара теста кинетике тромбоцита код деце оболеле од х ИТП

Установљено је да код пацијената са хроничним обликом ИТП, параметри оксидационог стреса корелирају у обрнутој пропорцији са животним веком тромбоцита добијеним тестом кинетике (Графикони 19. и 20.). Ни код хроничних пацијената са ИТП, где је верификована блага хиперхомицистеинемија није нађено да се вредности хомицистеина значајније разликују међу групама.

Графикон 19. Утицај животног века тромбоцита из теста кинетике на параметре ОС код деце оболеле од х ИТП

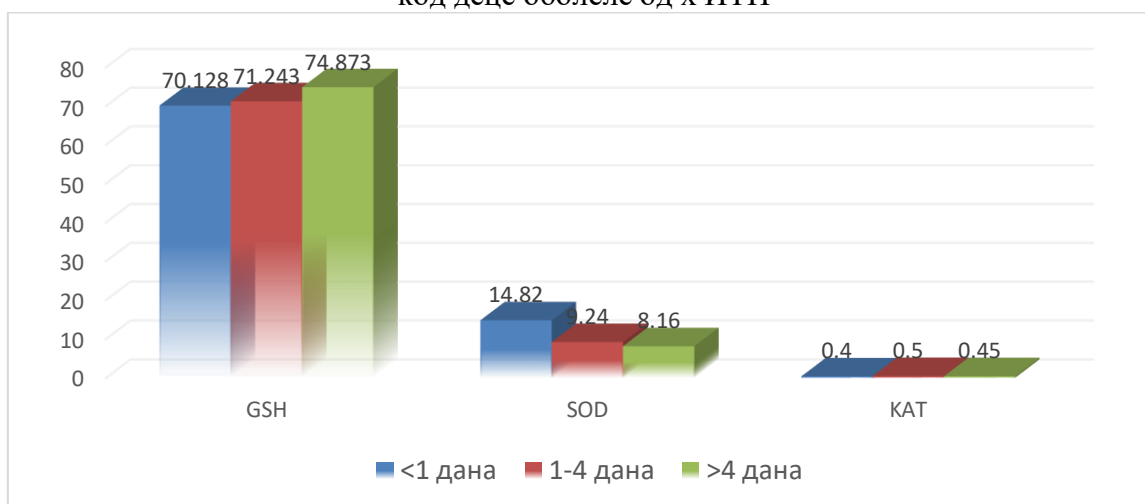


Графикон 20. Утицај животног века тромбоцита из теста кинетике на параметре ОС код деце оболеле од х ИТП



Такође, регистровано је да највише вредности антиоксидационе заштите имају пацијенти са дужим животним веком тромбоцита, изузев *SOD* где је добијен обрнути однос, више вредности *SOD* код пацијената са краћим животним веком тромбоцита (Графикон 21.).

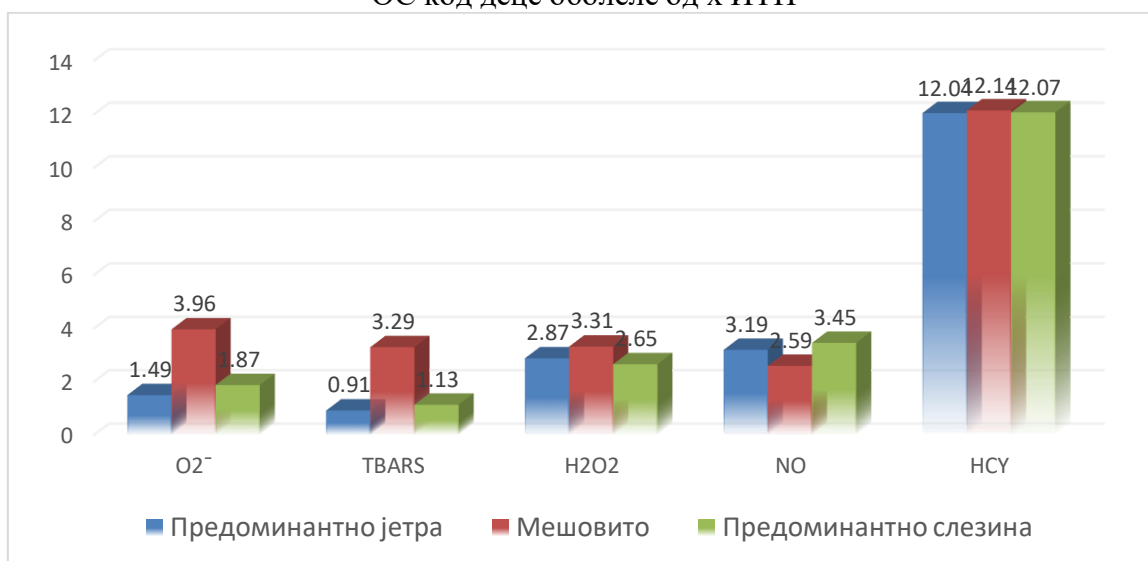
Графикон 21. Утицај животног века тромбоцита из теста кинетике на параметре *ADS* код деце оболеле од х ИТП



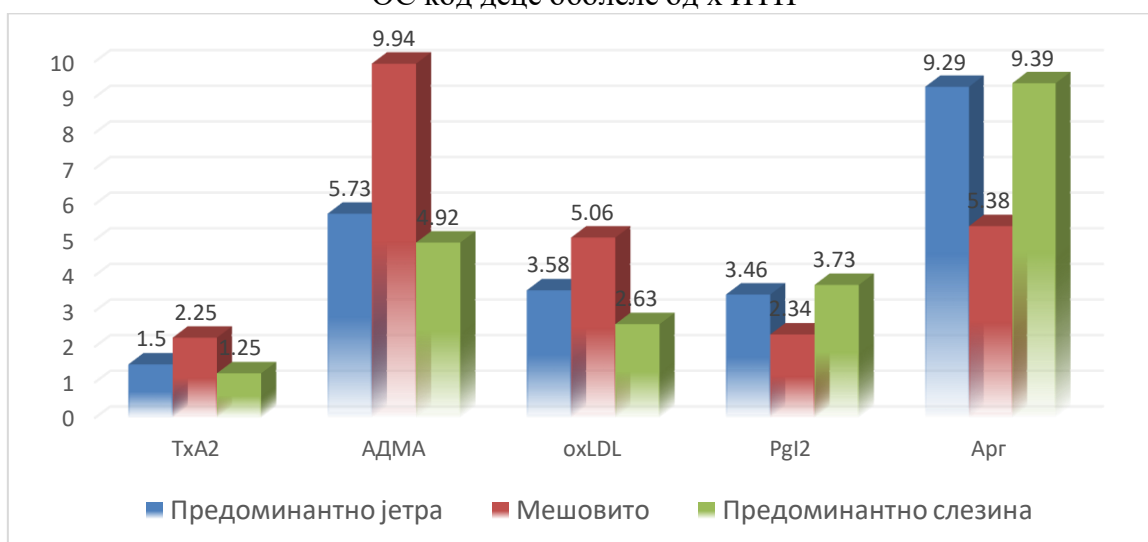
Код хроничних пацијената са ИТП поређењем параметара ОС и *ADS* у групама деце са различитим индексом продукције тромбоцита добијеном тестом кинетике, није установљена статистички значајна разлика.

Пацијенти са х ИТП којима се тромбоцити секвестрирају мешовито (подједнако у јетри и слезини) имају највише вредности O_2^- , H_2O_2 , *TBARS*, *TxA2*, АДМА и *oxLDL*, а најниже *NO*, *Pgl2* и Arg у односу на пацијенте са доминантно хепатичном, а посебно са доминантном секвестрацијом тромбоцита у слезини (Графикони 22. и 23.). Слично као и у претходним случајевима вредности хомоцистеина се не разликују значајније.

Графикон 22. Утицај места секвестрације тромбоцита из теста кинетике на параметре ОС код деце оболеле од х ИТП

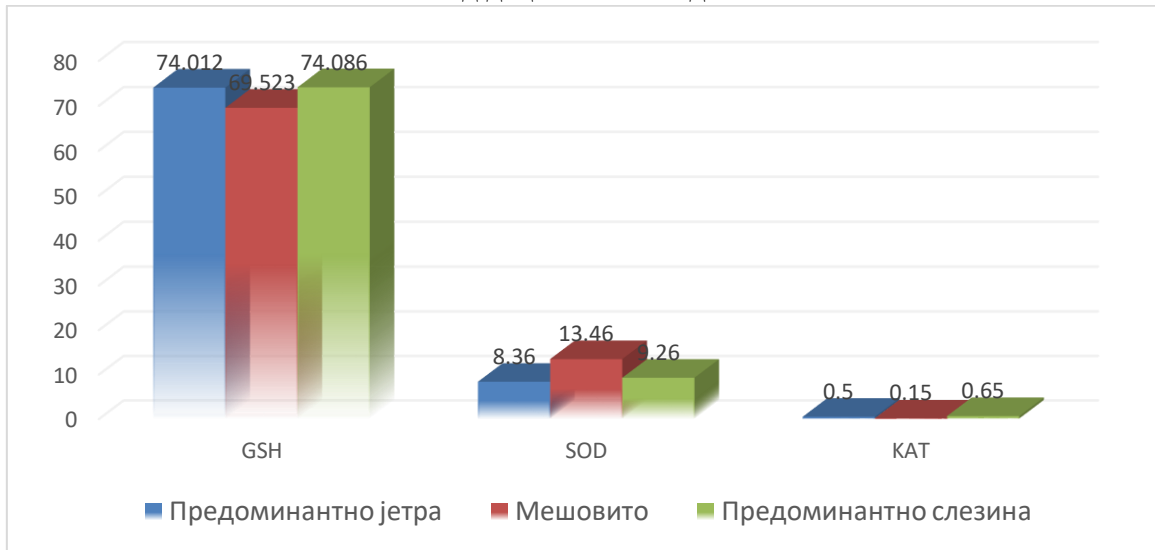


Графикон 23. Утицај места секвестрације тромбоцита из теста кинетике на параметре ОС код деце оболеле од х ИТП



Показано је да највише вредности антиоксидационе заштите имају пацијенти са секвестрацијом доминантно у слезини, изузев *SOD* где су највише вредности добијене код пацијената са мешовитом секвестрацијом тромбоцита (Графикон 24.).

Графикон 24. Утицај места секвестрације тромбоцита из теста кинетике на параметре ADS код деце оболеле од х ИТП



5. ДИСКУСИЈА

5.1. Основне клиничке карактеристике деце оболеле од ИТП

На нашем репрезентативном узорку од 90 деце оболеле од ИТП (102 укупно – 12 здраве деце), добијено је да полна расподела пацијената одговара подацима из литературе (Ж:М ~ 1,2 – 1,3:1) и да највећи проценат оболеле деце са хроничним обликом ИТП припада адолесцентном узрасту, са заступљеношћу од око 35%, док од новодијагностикованог облика ИТП углавном обољевају деца предшколског узраста (око 60%) [24, 25, 35]. Једна од најдокументованијих епидемиолошких разлика између ИТП у детињству и код одраслих је свакако израженија превласт жена међу одраслима оболелим у односу ~2:1, док је код деце ~1,3:1, што је свакако повезано са повећаном инциденцом аутоимунских болести код одраслих жена [49–51]. И у нашој групи је потврђена та чињеница, јер скоро 70% од свих болесника који имају неку придружену аутоимуноу болест припада женској популацији.

Увидом у анамнестичке податке, детаљ који се у литератури често помиње као један од маркера који може указати на хроничну форму болести код пацијената са новооткривеном ИТП је одсуство јасног узрочног фактора који је довео до појаве болести, попут претходне инфекције, вакцинације, убода инсекта и слично [44–46]. У нашој кохорти, скоро две трећине пацијената са хроничном ИТП у време дијагностиковања болести није имао података о јасном узрочном фактору који је покренуо имунолошки процес. Са друге стране, у нашој нд ИТП групи скоро трећина пацијената нема податак о јасном узрочном фактору, а од пацијената који су током периода праћења прешли у хроничитет четворо од шесторо није имало овај податак. Иако се ради о малом узорку, и у нашој групи су потврђени литературни подаци.

Око половине пацијената са нд ИТП је имало средње тешка крварења при постављању дијагнозе, са друге стране 20% је било асимптоматско на презентацији болести. Међу перзистентним и хроничним пацијентима доминирају асимптоматски или са благим знацима хеморагијског синдрома, док су 10% хроничних пацијената имали средње тешка и тешка крварења. Убедљиво доминантна места крварења код наших пацијената су хематоми по кожи, док је крварење из гингива, епистаксе или из других слузница углавном јаља код пацијената са тежом клиничком сликом. Нисмо имали пацијенте са интракранијалним и гастроинтестиналним крварењем. Свакако да је степен крварења до данас остављен појединачно клиничарима на процену, иако је покушано са формирањем скала за оцену крварења [41, 42], ипак постоји велика дискрепанца међу истраживачима на овом пољу. Свакако, асимптоматски пацијенти код нд ИТП се крећу у већини студија око 20%, за разлику од х ИТП где су резултати у различитим серијама од 10–70% [32, 35–37, 50]. Очекивано је да пацијенти са новодијагностикованом болешћу имају најизраженији хеморагијски синдром, а према досадашњем искуству из клиничке праксе, тако и према литературним подацима, хронични пацијенти са ИТП имају доследан модел кретања броја тромбоцита, па чак и доследан модел крварења током година, који се ремети у инфекцијама или при употреби нестероидних антиреуматика. Наше хроничне пацијенте смо сматрали асимптоматским само у случају да су након првог акутног напада болести имали клиничку ремисију, са одржавањем тромбоцитопеније. Скоро 75% пацијената је већ након годину дана било у стабилној асимптоматској фази болести, што је опет у корелацији са литературним подацима [35–37, 42, 50]. Око 35–40% пацијената са п ИТП има блажи *Bleeding severity score* 2, а само 10% са х ИТП има тешка, повремено по живот опасна крварења са скором 4 (Графикон 3.).

У складу са претходним подацима, међу нашим испитаницима са нд ИТП и п ИТП нема оних који су захтевали примену трансфузија компонената крви, док су 4 наша хронична пацијента због опсежних крварења имали потребу да приме трансфузије

концентрираних тромбоцита и/или деплазматисаних еритроцита. И ови проценти су слични осталим истраживачима, где се број трансфундованих пацијената креће између 5–15% [25, 35–37, 42, 50].

Још једна велика историјска разлика између педијатријског и адултног ИТП је инциденција коморбидних здравствених стања, присуство ≥ 1 коморбидитета код само 5% деце и $>30\%$ одраслих на презентацији болести и код 10–15% деце и 35–50% одраслих током 2 године праћења [49–51]. На нашем узорку, у свим испитиваним групама са ИТП деца доминантно немају других аутоимуних болести, али се учесталост мења, па 70% деце са нд ИТП је без других болести, док је тај проценат мањи код п ИТП (55%) и у х ИТП (око 40%). Са друге стране, само су појединачни примери пацијената са болестима штитасте жлезде (доминантно Хашимото тироидитис) или неким метаболичким поремећајима (синдром полицистичних јајника, инсулинска резистенција, гојазност), у групама са нд ИТП и п ИТП, док је тај број убедљивији код пацијената са х ИТП. Занимљиво да је у свакој групи регистровано од 25–30% пацијената који имају позитивна аутоантитела доступна дијагностици, без јасно испољене аутоимуне болести (Графикон 5.). Регистровано је присуство атитиреоглобулинских, антинуклеусних и/или лупус антикоагуланс антитела, као и позитиван *Coombs* тест (било директан или индиректан), појединачно или у комбинацији, али без било каквог клиничког испољавања аутоимуне болести или елемената за хемолизну анемију. У осталим студијама се често помиње присуство позитивних аутоантитела, али до сада није установљен њихов значај [20, 22, 23, 25, 44–46] и док поједини аутори препоручују њихово праћење, други постављају питање да ли их уопште треба радити [103, 104].

Увидом у породичну анамнезу, у скоро подједнаком проценту (око 30–35%) у породицама деце са ИТП у свим групама или нема никаквих познатих аутоимуних болести или их има више чланова домаћинства, а појединачни су случајеви са метаболичким болестима и болестима штитасте жлезде (Табела 2.). Мора се ипак приметити да пацијенти са хроничним обликом болести имају богатију породичну анамнезу у смислу аутоимуних болести. Само 4 испитаника је имало рођаке који су боловали или још увек болују од ИТП. Неколико студија је покушало да утврди генетску предиспозицију и значај аутоимуних болести у породици на саму појаву ИТП, тако и на развој хроничног облика болести, и сви су сложни у оцени да позитивна породична анамнеза доприноси и једној и другој појави, једино за сада нема конзистентних резултата везаних конкретно за генетску предиспозицију према развоју ИТП [25, 32, 37, 44–46, 103].

5.2. Основне лабораторијске карактеристике деце оболеле од ИТП

Свим нашим испитаницима је урађен скрининг хемостазе и основни биохемијски параметри у склопу искључења других болести и код сваког пацијента су били у референтним вредностима. Такође, због потребе да се код било какве цитопеније ураде поткласе имуноглобулина, код свих наших пацијената су и те вредности биле у референтним вредностима у складу са узрастом.

Нити један пацијент у нд ИТП и п ИТП није имао позитиван антиген на *Helicobacter pylori* из столице, али зато нешто више од 20% пацијената (6/29) из х ИТП групе је у неком тренутку имало позитиван тест. Троје од ових пацијената је имало и дигастричне сметње, и код њих је урађена и езофагогастродуоденоскопија, са дефинитивном потврдом уреза тестом и патохистолошком верификацијом. Код једног пацијента је у свакој следећој контроли тест био негативан, па није спроведена ерадикациона терапија, док је осталих 5 било на четворострукој терапији по протоколу у трајању месец дана. Занимљиво је да су сви ови пацијенти дечаци, са

асимптоматском (4/6) и благом клиничком сликом (2/6) и са бројем тромбоцита $>50 \times 10^9/L$. До сада нису утврђени механизми који би објаснили како *Helicobacter pylori* може утицати на патогенезу ИТП. Ранији ставови и анализе показују корелацију између инфекције са *Helicobacter pylori* и слабијег терапијског одговора код скоро половине болесника са ИТП, па теоријски, ерадикација помаже код акутног облика. Са друге стране, код дуготрајне хроничне ИТП ерадикациона терапија за *Helicobacter pylori* је мање ефикасна у побољшању тромбоцитопеније, међутим, сви ови резултати су и даље врло контрадикторни [19, 31]. Нема јасних доказа да ли су то пацијенти код којих би у сваком случају дошло до ремисије или је ерадикациона терапија и елиминација узрочника довела до исте и још увек се не зна тачна повезаност ова два ентитета [19, 31].

Примећено је да око 65–75% деце у свим групама са ИТП има хиповитаминозу Д, од тога инсуфицијенцију витамина Д има 15% деце са нд ИТП, док је тај број у п ИТП и х ИТП до 25% (Табела 3.). Последњих година је у сфери интересовања повезаност ова два ентитета, где је попут наше студије, у неким серијама установљена повезаност у преко 80%, али ипак постоје и докази да болести не доприноси у толикој мери само снижен ниво витамина Д, већ пре свега полиморфизам гена за рецептор витамина Д, али на ову тему свакако тек треба спровести опсежнија истраживања [39, 40]. Оно што стоји као чињеница је да се са суплементацијом витамином Д не може погрешити код пацијената са ИТП.

Екстремно високе вредности ЛДХ преко 750 U/L су карактеристика деце са нд ИТП (40%), а још половина њих има повишене вредности преко 450 U/L. Са друге стране, код пацијената са п ИТП у 65% и код пацијената са х ИТП у 40% вредности ЛДХ су у границама нормалних. Ово је очекивано, с обзиром да је ЛДХ интрацелуларни ензим, који се ослобађа појачаном деструкцијом тромбоцита. Са друге стране, обзиром на честе вирусне инфекције током којих уобичајно може доћи до пораста ЛДХ, у дечијем узрасту, за разлику од одраслих, ЛДХ није адекватан параметар за процену активности болести [49–51].

Једна трећина укупног броја тромбоцита се налази у синусоидима слезине где служи као резерва и једну трећину животног века проведу у слезини и одстрањивање остарелих тромбоцита се такође одвија највећим делом у црвеној пулпи слезине, а такође патофизиолошки механизам настанка антитромбоцитних антитела и најчешће место разградње тромбоцита код ИТП се одвија у слезини, због чега се овом органу придаје посебна пажња [3, 17, 25, 26]. Ни код једног пацијента са нд ИТП није уочена хепатоспленомегалија. Са друге стране, ехосонграфским прегледом абдомена код скоро четвртине хроничних пацијената (5/22 у п ИТП и 8/29 у х ИТП групи) је у неком тренутку током праћења верификована спленомегалија, али је на тесту кинетике тромбоцита тај број био мањи, само 4 испитаника у х ИТП групи. Тачно је да свака појава органомегалије аутоматски искључује дијагнозу ИТП, то ипак није примењиво када су у питању хронични облици, с обзиром да дуготрајна деструкција тромбоцита у ретикулоендотелијалном систему слезине неминовно доводи до њихове хиперплазије и узрочно до повремених увећања органа зависно од активности имунолошког процеса. Сличан проценат спленомегалија је верификован и од стране других истраживача, посебно оних који су се базирали на спленектомију као терапијску опцију ИТП-а [26, 53, 56, 57, 69]. Такође, било ултразвучно, током извођења теста кинетике или приликом спленектомије, код 17% испитаника (5/29) са х ИТП је уочена акцесорна слезина, док у осталим групама није верификована. Постоје само појединачни прикази случајева накнадног уклањања акцесорне слезине, у случају погоршања тромбоцитопеније након спленектомије, са добрим терапијским ефектом [58].

Средња вредност броја тромбоцита у групи са нд ИТП је била $14,7 \pm 3,6 \times 10^9/L$, знатно више вредности су регистроване код п ИТП $36,4 \pm 7,8 \times 10^9/L$, и код х ИТП $39,8 \pm 9,1 \times 10^9/L$. То је и очекивано јер скоро 70% пацијената са нд ИТП је имало број тромбоцита $<20 \times 10^9/L$, док је тај број значајно мањи код пацијената са п ИТП и х ИТП, свега око 20-25% пацијената и то само на појединим контролама, када не рачунамо клинички релапс болести (Табела 4.). Са друге стране, око 30% пацијената са нд ИТП је имало број тромбоцита $>20 \times 10^9/L$. Већи број тромбоцита од $30-50 \times 10^9/L$ (зависно од аутора) у тренутку дијагностиковања болести је један од битних критеријума за настанак хроничног облика [44–46]. Како у нашој студији, тако и у другим истраживањима, и поред огромног напретка у разјашњавању патофизиологије ИТП и даље велики број чињеница, а и резултати из клиничке праксе говоре у прилог томе да је број тромбоцита ипак водећи фактор који одређује тежину клиничке слике код пацијената са свим облицима ИТП [19, 25, 32, 37, 43, 44, 53, 105]. Релативно ретко се дешава да пацијенти са бројем тромбоцита $>20-30 \times 10^9/L$, који можемо сматрати задовољавајућим бројем, посебно у хроничном облику, више крваре него пацијенти са мањим бројем тромбоцита, што нас поново враћа на почетак и компликован патофизиолошки механизам болести [25, 37, 53, 105].

У групи са нд ИТП је регистрована највећа средња средња вредност волумена тромбоцита (*Mean platelet volume – MPV*) од $11,2 \pm 1,4 fL$, док је волумен тромбоцита значајно мањи код пацијената са дужим трајањем болести, $10,3 \pm 1,9 fL$ у п ИТП и $10,4 \pm 1,7 fL$ у х ИТП групи. Овакав феномен говори у прилог томе да су вероватно крупнији тромбоцити, и у метаболичком смислу и у процесу хемостазе активнији, јер својом величином покушавају да надокнаде недостатак у броју, који је доминантан у акутној форми болести [4, 106]. Сигурно је да у каснијем току болести у томе учествују и други фактори, посебно микросредина костне сржи и да се временом у хроничном облику костна срж навикне да продукује нешто веће тромбоците, па би ово могла да постане тема неког будућег истраживања. О значају *MPV* код болесника са ИТП говоре бројна истраживања, поједини аутори су чак повезивали повишен *MPV* у новооткривеној форми да је један од маркера хроничног облика болести [105, 106].

Код све деце са ИТП је урађен цитолошки преглед аспирата костне сржи и ни у једној нису пронађене диспластичне промене, али је зато добијен занимљив резултат да од 20-25% пацијената са ИТП имало ретке мегакариоците у косној сржи, за разлику од осталих који су имали очекивано нормалну костну срж или хиперпродукцију мегакариоцита (Табела 4.). То указује на чињеницу да аутоантитела поред периферног утицаја на тромбоците, могу да се везују и за мегакариоците и да инхибирају њихову матурацију или да доведу до њихове деструкције, тако да тромбопоетин не може да испољи своју улогу. Ово посебно долази до изражаја код болесника са ИТП који крваре, а имају век тромбоцита близу нормале. То указује на могућност да су аутоантитела директно оштетили мегакариоците или да делују на цитокине неопходне за раст и пролиферацију мегакариоцита или да само неки тромбоцити представљају циљ за антитела, док на друге не делују [20, 22, 23, 27, 107, 108].

5.3. Примењени терапијски модалитети код деце оболеле од ИТП

Петоро асимптоматских пацијената у новодијагностикованој форми је подвргнуто приступу *wait and see*, ни један није доживео комплетну ремисију, тако да су код свих примењени ив имуноглобулини. Од 27 деце са нд ИТП која су праћена најмање годину дана, више од половине (15/27) је доживело потпуну клиничку и лабораторијску ремисију након терапије ив имуноглобулинима, код осталих се јавио углавном лабораторијски рецидив болести, због чега је покушано са новим *watch and wait* приступом, без ефекта, а затим при преласку у перзистентни облик, и са терапијом

системским кортикостероидима – *Pronison*-ом и пулсним дозама *Deksametazon*-а (по 7/22 п ИТП пацијента). Краткотрајним одговором на примењену иницијалну терапију ив имуноглобулинама смо сматрали рецидив након 4–6 недеља од примене лека, а краткотрајним одговором на системске кортикостероиде, рецидив по смањивању дозе *Prednizon*-а или неадекватном реактивношћу на *Deksametazon*. Око 20% (6/27) наших нд ИТП пацијената је било резистентно на примењену терапију (изостанак ремисије или рецидив у краћем периоду), код тих пацијената је болест трајала дуже од 12 месеци и након тога су ушли је у хроничну фазу болести.

Код пацијената са п ИТП око 25% (5/22) је доживело спонтану ремисију, а они који су захтевали примену терапије, поред пацијената лечених системском кортикостероидном терапијом, код троје је због неуспеха терапије, покушано и са имуномодулаторном терапијом *Mycophenolat mophetil*-ом. Код сва три пацијента на имуномодулаторној терапији, као и код 3 пацијента који су били само на терапији *Pronison*-ом, болест је прогредирала ка хроничном облику. Пацијенти на пулсним дозама *Deksametazon*-а и преостала 4 на терапији *Pronison*-ом су у комплетној ремисији. Око 35% пацијената са х ИТП (10/29) је захтевало употребу терапије, остали су били асимптоматски. 3 пацијента су спленектомисана, уз комплетну ремисију, 3 пацијента су на терапији тромбоеитинским рецепторима, уз клиничку ремисију, код 4 пацијента је поред остале терапије покушано и са различитим протоколима цитостатицима, код 3 од 4 је учињена и спленектомија без успеха и сви имају од 1-5 епизода тешког хеморагијског синдрома годишње када захтевају и трансфузије деривата крви (Графикони 6.).

Поред поменутих стандардних терапијских опција за лечење нд ИТП, у последњим годинама су се појавили и други приступи са коришћењем поједине терапије 2. линије, али већина истраживача који су испитивали ефекте стандардне терапије имају резултате сличне овим [22, 28, 29, 35, 42]. Велика већина аутора је раније сматрала да се са терапијом код дечије акутне ИТП можда и претерује и да би увек када степен крварења то дозвољава требало пробати са опсервационим приступом [109], али поред свакако дужег времена за постизање ремисије као лоше стране, такав приступ није имао никаквог ефекта у смислу дужег трајања постигнуте ремисији или мање појаве хроничитета у односу на лечену групу деце [22, 28, 29, 36, 47–50]. Већина истраживача показује јако добре резултате примене пулсних доза *Deksametazon*-а [51–53], као и добре резултате агонистима тромбоеитинских рецептора, чак и у новодијагностикованој форми. У нашој кохорти нисмо користили ни један тренутно експериментални лек [29, 48–50].

Наши пацијенти са нд ИТП који су излечени након примене ив имуноглобулина показују сличан образац испољавања болести када се узму у разматрање поједини клинички и лабораторијски параметри, без изузетка сви су имали број тромбоцита $<20 \times 10^9/L$, средњи волумен тромбоцита $>10 fL$ и хиперпродукција мегакариоцита у костној сржи, а занимљиво је да је 60% њих је имало средње тешка или тешка крварења при постављању дијагнозе. Насупрот томе, пацијенти чија је болест прогредирала ка хроничитету су имали већи број тромбоцита, који су нормалне величине и са нормалним или ретким мегакариоцитима у костној сржи и равномерном расподелом крварећих и асимптоматских пацијената (Табела 5.). Овако нешто се показало као правило из клиничке праксе и увидом у литературне податке, с обзиром да пацијенти који имају бурнију имунолошку реакцију, која са једне стране доводи до озбиљне тромбоцитопеније и узрочно озбиљнијих крварења, а са друге стране, до адекватне реакције костне сржи у смислу повећане продукције крупних тромбоцита, исто тако имају бржи и бољи терапијски одговор на ив имуноглобулине [22, 28, 29, 36, 47–50]. Код пацијената са слабијим имунолошким одговором, број тромбоцита већи од 30–

$50 \times 10^9/L$ (зависно од аутора) у тренутку дијагностиковања болести, посебно код оних који имају и хеморагијски синдром, је препознат као један од најбитних критеријума за настанак хроничног облика, поред непостојања јасног узрочног фактора који је покренуо болест и женског пола у адолесценцији, који су мање значајни критеријуми [44–46]. Такође је примећено да сви наши излечени испитаници нису имали придружених аутоимуних болести, изузев ИТП и скоро 70% њих има негативну породичну анамнезу у смислу аутоимуних болести. Са друге стране, пацијенти који су током праћења прешли у хронични облик болести су без изузетка имали других аутоимуних болести, поред ИТП и позитивну породичну анамнезу. Већ је поменуто да се неколико студија бавило генетском предиспозицијом и значајем аутоимуних болести у породици на саму појаву ИТП, тако и на развој хроничног облика болести, али за сада нема конзистентних резултата везаних конкретно за генетску предиспозицију према развоју ИТП [25, 32, 37, 44–46, 103].

Код пацијената код којих болест прогредира ка перзистентном или хроничном облику су добијене потпуно другачије корелације са клиничким и лабораторијским параметрима, што још једном потврђује чињеницу о различитом патофизиолошком механизму настанка ова два стања [25, 35, 44–46]. Код пацијената са п ИТП доказано је они пацијенти који су захтевали терапију системским кортикостероидима су у скоро 80% без присуства других аутоимуних болести, али зато преко 70% има позитивну породичну анамнезу и углавном су са благим знацима хеморагијског синдрома. За разлику од акутног облика, очигледно је да се организам временом прилагођава на тромбоцитопенију и скоро 85% п ИТП испитаника је имало задовољавајући број тромбоцита $>20 \times 10^9/L$, од чега 50% чак број тромбоцита $>50 \times 10^9/L$, исти проценат је имао средњи волумен тромбоцита лако повећан и око 80% је имало хиперпродукцију мегакариоцита у костној сржи, док са другим параметрима не постоје тако јасне корелације (Табела 6.). Насупрот томе, када су у питању пацијенти са х ИТП, без обзира да ли су асимптоматски или су због озбиљних знакова хеморагијског синдрома морали да примају терапију друге или треће линије, није добијена корелација ни са једним клиничким и лабораторијским параметром (Табела 7.), тако да се на жалост, издваја мањи број крварећих пацијената са сличним или потпуно идентичним лабораторијским испољавањем болести као и код асимптоматских пацијената и за сада није доказано шта разликује ове две групе хроничних пацијената [25, 44–46].

5.4. Тест кинетике тромбоцита код деце са хроничним обликом ИТП

Извођење теста кинетике тромбоцита радиоактивним обележивачем препоручује се код свих пацијената са акутном ИТП који имају неадекватан одговор на иницијално примењену терапију или код којих болест прогредира ка хроничном облику. Код свих испитиваних пацијената је у периоду око годину дана од постављања дијагнозе ИТП, а код појединих и након тога, ради поновне евалуације због неадекватног терапијског одговора, учињен тест кинетике тромбоцита. Средњи животни век тромбоцита у нашој испитиваној групи је био око 22h. Упадљиво је да највећи број пацијената (скоро 70%) са х ИТП има средњи век тромбоцита краћи од једног дана, али са друге стране, 15% пацијената је имао скоро нормалан животни век тромбоцита (Табела 8.). То указује на већ речену чињеницу да је патофизиолошки концепт настанка болести код појединих болесника прилично компликован и да ако тромбоцити имају нормалан животни век, у том случају највероватније дисфункција В-лимфоцита и цитотоксичних Т-лимфоцита, као и деловање аутоантитела на мегакариоците, као и релативни или апсолутни недостатак тромбопоетина, у основи доводи до слабе продукције тромбоцита и узрочно до тромбоцитопеније [23, 25, 26, 32, 33].

Међутим, раније студије су животни век, а посебно индекс продукције тромбоцита приказивале као најмање поуздане параметре за било какво тумачење, али су ове студије пре свега биле базиране на процени терапијског успеха спленектомије [64, 77, 79, 80]. У нашој групи пацијенти са хроничном ИТП су у скоро подједнаком проценту (35%) имали или нормалан, или снижен или јако низак степен продукције тромбоцита у костној сржи. Са друге стране, са становишта процене успеха терапије већина аутора се слаже да најзначајније место припада индексу (месту) секвестрације тромбоцита [64, 77, 79, 80]. Када говоримо о нашој кохорти, код више од половине пацијената (60%) се слезина презентује као доминантни или једини орган распадања тромбоцита, а код око 30% постоји мешовито распадање, скоро подједнако у јетри и слезини. Код око 10% слезина није била уопште укључена у процес деструкције тромбоцита, већ је то преузела јетра, док је код само 1 пацијента поред јетре, добијено да се секвестрација тромбоцита одвијала и у тимусу, желуцу, тестисима и плућима (Табела 8.). Тест кинетике тромбоцита нам још једном потврђује да се патофизиолошки супстрат дешава подједнако како у костној сржи на нивоу мегакариоцита, тако и у периферној крви на нивоу тромбоцита [17, 21, 29, 39, 42, 87].

Наведени резултати доприносе закључку да место секвестрације тромбоцита у великој мери може одредити прогнозу болести, обзиром да доминантна секвестрација у слезини, поред тога што је има највећи број пацијената, ако је прате озбиљнија крварења, спленектомија се намеће као додатна терапијска опција. Са друге стране међу пацијентима са мешовитом и доминантном секвестрацијом у јетри треба тражити онај мањи број пацијената (литературно око 10%) који имају озбиљна крварења и резистенцију на терапију и код којих није јасно зашто се цео процес дешава на тај начин и шта их разликује од осталих пацијената који имају потпуно идентичан лабораторијски образац болести [21, 29, 39, 42].

Различите студије препоручују тест кинетике у склопу преоперативне одлуке о спленектомији као помоћног предиктивног инструмента, па тако студија из наше земље, Италије и Велике Британије на 40, 65 и 91 пацијенту су уочиле високо значајну корелацију између резултата спленектомије и места секвестрације тромбоцита, док животни век и продукција тромбоцита немају никакву корелацију са терапијским одговором и стопом релапса. Резултат спленектомије је био повољан код свих пацијената са ИТП са секвестрацијом обележених тромбоцита доминантно у слезини. Био је неповољан код пацијената са доминантном секвестрацијом у јетри, док код пацијената са мешовитом секвестрацијом резултати спленектомије су били више неповољни него повољни [77, 78, 80, 81]. Са друге стране, Белгијска група истраживача сматра да преоперативни тест кинетике тромбоцита не треба препоручивати због неконзистентних резултата и непостојања довољне корелације, позивајући се опет на репрезентативан узорак од 92 пацијента [79]. Све ове студије су спровођене на адултним пацијентима.

5.5. Корелација оксидационог стреса и антиоксидационе заштите и идиопатске тромбоцитопеничне пурпуре

Када говоримо о оксидационом стресу (ОС) установљено је да он представља поремећену равнотежу између стварања реактивних кисеоничних врста (*Reactive Oxygen Species*—*ROS*) и индивидуалне способности организма да се детоксикују ове високо реактивне материје. Са друге стране, антиоксидациони капацитет организма (*Antioxydant Defence System* – *ADS*) ограничава оштећења настала деловањем *ROS* и тако се одржава одређени редокс баланс у организму [74–77]. Реактивне врсте кисеоника су препознате као важни регулатори различитих система у организму, укључујући и имуни систем, где границе нису јасне када физиолошко деловање

прелази у патолошко стање, тако да улога *ROS* и промена вредности ОС није још увек разјашњена и потпуно схваћена [74]. Бројна претходна истраживања су показала да је повишен ОС и смањен *ADS* дефинитивно укључен и у компликовану патогенезу ИТП и да може корелирати са тежином болести и бројем тромбоцита [78–86, 88–91].

Први извештаји о оксидационој дисрегулацији код пацијената са акутном ИТП датирају из 1984. године у раду *Ohno* и сарадника [81], а крајем осамдесетих и током деведесетих година прошлог века је неколико група истраживача покушало лечење како акутне, тако и хроничне ИТП суплементацијом аскорбинском киселином, као јаким антиоксидационим средством, са врло контрадикторним резултатима [82, 83]. Једна студија на узорку сличном нашем, потврдила је да је укупни ОС код педијатријских пацијената са ИТП повишен и код акутног и код хроничног облика и да је број тромбоцита позитивно корелирао са *ADS*, а негативно са ОС пре и после третмана [79], што је слично потврђено и у раду друге турске истраживачке групе [89]. На нашем репрезентативном узорку, показано је да су сви испитивани параметри оксидационог стреса, изузев азот монооксида (*NO*), простациклина (*PgI2*) и аргинина (Арг), значајно повишени код пацијената са ИТП, како код новодијагностикованог, тако и код перзистентног и хроничног облика, у односу на контролне групе, што дефинитивно потврђује претходно изречене чињенице.

Идеја ове студије била је да се процене вредности биомаркера системског оксидационог стреса и активности ендогеног антиоксидационог одбрамбеног система у различитим стадијумима ИТП, пре и после терапијских процедура. Оксидациони стрес остаје један од најштетнијих етиопатогенетских фактора у разним болестима, укључујући хематолошке поремећаје као што су анемија, леукемија, малигни меланом, болест српастих ћелија, β -таласемија [110–115]. Оксидациони стрес у патогенези ИТП вероватно игра чак и значајнију улогу, имајући у виду аутоимуноу позадину болести, у поређењу са хематолошким обољењима друге етиологије. Пацијенте са ИТП смо класификовали у три стадијума болести: новодијагностиковани ИТП (нд ИТП), перзистентни ИТП (п ИТП) и хронични ИТП (х ИТП), према претходно дефинисаним критеријумима, и измерили биомаркере системског оксидационог стреса и упоредили вредности пре и после терапијских поступака и са здравом децом. Поред тога, такође смо упоредили биомаркере оксидационог стреса / антиоксидационе заштите између здраве популације и деце са претходно излеченим ИТП (и ИТП), као и код оболелих испитаника са п ИТП и х ИТП у егзацербацији.

Поређећи групе деце са ИТП, убедљиво највише средње вредности O_2^- , *TBARS*, *TxA2*, АДМА и *oxLDL* забележене су код пацијената са новооткривеном ИТП у време постављања дијагнозе, док су вредности истих параметара у перзистентном и хроничном облику скоро па двоструко мање (Табеле 9. и 10.). Када се осврнемо на исте те пацијенте у фази релапса у перзистентном и хроничном облику (Графикони 13.–17.), примећено је да се у тим случајевима вредности O_2^- , *TBARS* и *oxLDL* драстично повећавају у односу на остале испитиване параметре ОС. Са друге стране, сва три поменута параметра, након терапије ив имуноглобулинима и системским кортикостероидима показују значајну регресију, скоро нормализацију вредности, док суплементација препаратом аскорбинске киселине практично не утиче на њих (Графикони 7., 8., 13.–17.). То се све делимично може објаснити њиховом патофизиолошком улогом у имуној систему.

Примарна улога фагоцита је одбрана домаћина од микроорганизама, које убијају фагоцитозом, након чега следи ослобађање *ROS* и протеолитичких ензима унутар фагозома. *ROS* се генерише у процесу "респираторног праска", којим се троше велике количине кисеоника, који се претвара у високореактивне супероксидне радикале, који играју важну улогу у елиминацији микроорганизама [99, 116]. Ако знамо да је

инфекција један од главних покретача имуног одговора у патогенези ИТП, а такође и један од главних узрока настанка релапса код пацијената са хроничним формама болести, јасно нам је зашто се ови параметри издвајају као једни од најзначајнијих. Међутим, уочљива је једна занимљива разлика када се узму у обзир пацијенти са нд ИТП који су праћени најмање годину дана. У тој групи је регистровано да су вредности O_2^- , *TBARS* и *oxLDL* упадљиво највеће код пацијената са нд ИТП који су имали комплетан опоравак после терапије, за разлику од пацијената код којих је болест отишла у правцу перзистентног или хроничног ИТП (Графикони 10. и 11.). То очигледно говори у прилог различите патофизиолошке позадине акутне и хроничне ИТП, која је вероватно присутна од самог почетка, а током трајања болести додатно постаје уочљива. На пример, знамо да је један од највише спомињаних фактора за развој хроничног облика болести управо недостатак јасног узрочног догађаја, попут инфекције, вакцине или уједа инсекта, који је покренуо имунолошки процес, што само потврђује претходно изнете чињенице везане за процес генерисања *ROS* у овим стањима [45, 46].

Антигена мимикрија која покреће развој антитромбоцитних аутоантитела и појачана фагоцитна активност макрофага су имплицирани као патогенетски механизми којим започиње процес уништавања тромбоцита обложених аутоантителима и ослобађају се нови страни пептидни фрагменти, који се поново представљају *T*- и *B*-лимфоцитима и врше поновну стимулацију имуног система. Као резултат свих ових процеса долази до повећане липидне пероксидације мембране тромбоцита, ДНК, различитих протеина и липида [27, 28, 74–78, 116]. Очигледно је да се сличан процес дешава и у стању релапса код пацијената са перзистентним и хроничним ИТП. По мало неочекивано, суплементација препаратом аскорбинске киселине код х ИТП, скоро па не утиче на вредности ОС. Са друге стране, ив имуноглобулини који везују аутоантитела и делују инхибиторно на пролиферацију *B*-лимфоцита и њихову продукцију, као и познато антиинфламаторно деловање системске кортикостероидне терапије, доводе до смањења липидне пероксидације и код нд и код п ИТП [27, 44, 74–78]. Међутим, примећено је да знатно боље ефекте на смањење ОС пружа терапија ив имуноглобулинима у односу на системске кортикостероиде, а са друге стране примећено је и да постоји статистички битна разлика у утицају различите системске кортикостероидне терапије на параметре ОС, па тако терапија пулсним дозама *Deksametazon*-а је делотворнија на смањење ОС од терапије *Pronison*-ом.

За разлику од колега који су показали да долази до значајне редуције ОС након терапије високим дозама *Metilprednizolon*-а у акутној фази [117], *Akbayram* и сарадници нису пронашли значајне разлике након третмана стероидима, напротив скоро супротне ефекте [79]. Велика већина истраживања која су се бавила овом темом су сложна у оцени да ив имуноглобулини дефинитивно смањују ОС и повећавају *ADS* [30, 78–80, 84, 88–90], али постоји само неколико студија које се баве ефектима *Metilprednizolon*-а на редокс статус код ИТП са контрадикторним резултатима. Теоријски, може се поставити и питање да ли се вишак оксидационог стреса може чак и спонтано решити, што се не тако ретко и дешава, јер из клиничке праксе знамо да постоје пацијенти који иницијално имају знаке хеморагијског синдрома, а релативно брзо самоограничавајућу болест, без примењене терапије.

С' обзиром да је код пацијенти са нд ИТП који су праћени најмање годину дана, као и за O_2^- , *TBARS* и *oxLDL*, примећена разлика и код осталих параметара оксидационог стреса, али у мањем обиму (H_2O_2 , *TxA2*, АДМА као повишени и *NO*, *PgI2* и *Arg* као снижени), између оних пацијената који су имали комплетан опоравак у односу на оне код којих је болест прогредирала ка хроничном облику, дефинитивно можемо рећи да се та два патофизиолошка процеса разликују (Графикони 10. и 11.).

Zhang и колеге су анализом генске експресије чак доказали да код педијатријских пацијената постоје различити молекуларни механизми акутног и хроничног ИТП, у путевима повезаним са ОС, од чега је најзначајнија прекомерна експресија ванин-1 рецептора, која је повезана са прогресијом у хронични ИТП, што може да имплицира и различиту патогенезу ова два стања када су у питању ОС и *ADS* [88]. Студије код здравих особа показале су малу експресију ванин-1 рецептора у различитим ћелијама крви. Изложеност мононуклеарних ћелија крви индукторима ОС изазива драматично појачану експресију ванин-1 рецептора, што указује на његову улогу као сензора ОС у епителним ћелијама [88]. Још једна разлика је примећена у равнотежи тиол / дисулфида, која је поремећена у корист дисулфида код акутног ИТП, а та равнотежа остаје стабилна код хроничних ИТП пацијената, посебно оних са лакшом клиничком сликом, којима није потребно лечење [89]. У последњих неколико година тиол / дисулфидни баланс је у сфери интересовања за многе аутоимуне болести.

Зато што као и O_2^- , тако и H_2O_2 спада у високореактивне кисеоничне врсте настале током "респираторног праска" у одбрани организма од инфекције [99, 116], добили смо изненађујући резултат да не постоји значајна разлика међу групама деце оболеле од ИТП у вредностима водоник пероксида (Табела 9.). Тачно је да попут осталих параметара прати шаблон да се смањује након терапије ив имуноглобулинима и системским кортикостероидима и да не реагује на суплементацију аскорбинском киселином код х ИТП, али зато само незнатно расте у рецидиву код п ИТП, док се уопште не мења када је у питању рецидив х ИТП (Графикони 7., 8., 13.–17.). Из овога се може произвести закључак да макар када је у питању патофизиологија ИТП, очигледно има разлике у деловању *ROS* код нд ИТП. Са друге стране, највероватније се организам током хроничног процеса већ делимично навикао на постојање лако повишеног ОС [90], али остаје нејасно зашто и H_2O_2 не расте у рецидиву х ИТП. Увидом у литературне податке и резултате студија које су се бавиле овом темом, аутор није пронашао јасно објашњење оваквих вредности H_2O_2 у различитим стадијумима ИТП. Очигледно је да је патофизиологија хроничне ИТП јако компликована, чак и на нивоу појединачних параметара оксидационог стреса.

Азот моноксид (*NO*) као један од највише испитиваних маркера оксидационог стреса и као антикоагуланс, изазива вазорелаксацију и инхибира адхезију и агрегацију тромбоцита, чиме се спречава тромбоза, због чега је опсежно проучаван у атеросклерози и исхемијској болести срца [5–7]. ИТП може бити повезана са смањењем биорасположивости *NO*. Важна алтернативна функција *NO* је у модулацији производње тромбоцита из мегакариоцита, па се повећањем нивоа *NO* може благотворно деловати на мегакариоците, побољшавајући производњу тромбоцита. Међутим, у одбрани домаћина од вируса, *NO* је такође један од кључних посредника за имуне функције макрофага [96]. Имунолошке студије фаворизују неравнотежу у подгрупама *CD4* помоћничких *T* лимфоцита у патогенези ИТП, са доказима који подржавају поларизацију у правцу *Th1* имунолошког одговора *in vitro* [27, 28]. Имунолошка регулаторна улога *NO* је одавно препозната у смислу да селективно инхибира експанзију *Th1* ћелија негативном повратном спрегом након инфекција и антигенске стимулације [96].

NO и *L*-аргинин као његов прекурсор су испитивани параметри оксидационог стреса чије су средње вредности у групама деце са ИТП снижене у односу на контролне групе (Табеле 9. и 10.). Са друге стране, њихове вредности варирају супротно осталим параметрима када поредимо групе оболеле деце, на тај начин што се повећавају након терапије ив имуноглобулинима и системским кортикостероидима, не реагују на суплементацију аскорбинском киселином код х ИТП, и поново значајно падају у рецидиву како код п ИТП, тако и х ИТП (Графикони 7., 8., 13., 14., 16., 17.), што

потврђује претходно изречене тврдње о повезаности *NO* (и узрочно његовог прекурсора *L*-аргинина) и функције тромбоцита. Због свог вазодилататорног деловања на циркулацију и смањених вредности у бројним стањима са повећаним *OS*, као и због немогућности да се сам *NO* синтетише као терапијско средство, код многих болести је предложено да се додатком *L*-аргинина као терапијском опцијом покуша у спречавању даљег напредовања болести, укључујући митохондријалну енцефаломиопатију, лактичну ацидозу и синдром сличан можданом удару, вероватно најчешћу митохондријалну болест. Влада мишљење да *L*-аргинин може да обнови нивое *NO* у крвним судовима, побољшавајући пре свега церебрални проток крви [118].

Са друге стране, ензимима катализована посттранслациона модификација гванидинске групе остатака *L*-аргинина у протеинима и њихова каснија хидролиза производе три метилована аналога аргинина: монометиларгинин, асиметрични диметиларгинин (АДМА) и симетрични диметиларгинин, који су инхибитори активности азот оксид синтетазе [96]. Асиметрични диметиларгинин (АДМА) који је одређиван у овој студији, је метаболички нуспроизвод континуираних процеса модификације протеина у цитоплазми свих људских ћелија. Уско је повезан са *L*-аргинином, настаје његовом деградацијом (која бива интензивна код акутних облика и релапса ИТП) и у случају његових повећаних вредности доводи до даљег ометања и блокирања *L*-аргинина у производњи *NO* [96]. Сходно наведеним чињеницама, јасно је зашто смо добили овакве резултате да се највеће вредности АДМА региструју код пацијената са нд ИТП и у релапсима болести код п ИТП и х ИТП, а најмање у контролним групама и да драстично опадају након терапије ив имуноглобулинима и системским кортикостероидима, а практично не реагују након употребе аскорбинске киселине код х ИТП пацијената. Очекивали смо да ћемо добити ниже вредности АДМА у адолесцентској групи и код х ИТП (јер су адолесценти доминантно у тој групи), због чињенице да су поједини аутори испитујући повезаност атопијских болести и метаболизма *L*-аргинина и азот оксида, установили да се концентрација АДМА у плазми и урину драстично смањује од детињства до одраслог доба [119], али очигледно је кратак временски период у питању или недовољан број пацијената, да би се испољиле статистички значајне разлике.

Када говоримо о циклооксигеназном систему у тромбоцитима, тј. метаболизму арахидонске киселине, посебно се издвајају два метаболита простагландин и тромбоксан А₂. Простагландин (такође назван простагландин *I*₂ или *PgI*₂) је члан еикосаноидне породице молекула липида, а синтетише се у ендотелним ћелијама и делом у тромбоцитним гранулама. *PgI*₂ углавном спречава формирање тромбоцитног чепа укљученог у примарну хемостазу тако што инхибира активацију тромбоцита. Такође је ефикасан вазодилататор [2–7, 13]. Интеракције *PgI*₂ су у супротности са интеракцијама тромбоксана (*TxA*₂), другог еикосаноида. *TxA*₂ има протромботичка својства, јер стимулише активацију и агрегацију тромбоцита и он је познати вазоконстриктор, а поред ендотелних ћелија и тромбоцитних гранула, синтетише се и у бројним ћелијама интерстицијумског матрикса [2–7, 120]. Оба молекула су изведена из арахидонске киселине под дејством више ензима: циклооксигеназе 1 и 2, фосфолипазе А₂ и својих појединачних синтетаза и раде заједно са супротним ефектима агрегације тромбоцита, тј. делују као физиолошки антагонисти. Ово снажно сугерише механизам кардиоваскуларне хомеостазе између ова два хормона у односу на васкуларно оштећење. Поједине студије су доказале да код пацијената са ИТП дефинитивно постоји хиперактивност тромбоцитне циклооксигеназе *in vivo* [13, 100, 121, 122], што очекивано доводи до иницијалног повећања вредности *PgI*₂ и *TxA*₂, с обзиром на појачану деградацију тромбоцита у ретикулоендотелијалном систему и ослобађању свих материја из тромбоцитних гранула, као и због појачане секреције од стране

активираних ендотелних ћелија [2–7]. Али у наставку процеса, који је очигледно врло брз, као компензаторни механизам, вредности *PgI2*, као вазодилататора и једног од најачих инхибитора агрегације тромбоцита, се смањују, а вредности *TxA2* се повећавају јер је потребно да се тако смањен број тромбоцита у ИТП компензаторно хиперагрегира не би ли што боље направио хемостазу у новонасталим условима [13, 121]. Поред тога, на експерименталном моделу мишева је доказано и да оба метаболита арахидонске киселине имају битну негативну улогу и утицај на успорену Мкц-поезу у косној сржи [100]. Када узмемо у обзир све наведене чињенице, добијени су и очекивани резултати да се највеће вредности *TxA2*, а најмање *PgI2* региструју код пацијената са нд ИТП и у релативима болести код п ИТП и х ИТП, а најмање вредности *TxA2*, а највеће *PgI2* у контролним групама и да вредности драстично опадају у случају *TxA2* и расту у случају *PgI2* након терапије ив имуноглобулинима и системским кортикостероидима, а практично на њих не делује употреба аскорбинске киселине код х ИТП пацијената.

За разлику од осталих испитиваних параметара, вредности *НСУ* се код пацијената са ИТП не мењају значајније након терапије ив имуноглобулинима и системским кортикостероидима, као и након суплементације аскорбинском киселином, а такође ни у случајевима рецидива болести. Лако повећане вредности *НСУ* су регистроване само код х ИТП, док су код друге две групе са ИТП вредности *НСУ* на горњој граници нормале, али у сваком случају значајно више него у контролним групама (Табела 9.). Сматра се да хомоцистеин изазива ендотелну дисфункцију и оштећење биорасположивости *NO*, а као један од могућих механизма деловања је стварање O_2^- и H_2O_2 , који повећавају оксидативну деградацију *NO* [99]. Зато остаје нејасно зашто се вредности *НСУ* не мењају значајније на примењену терапију, мада се морају узети у обзир и велике индивидуалне разлике међу пацијентима у нд и п ИТП (велика СД). Хиперхомоцистеинија, иако ретка у дечијем узрасту, у х ИТП је делимично и очекивана, с обзиром на дуготрајно повишен ОС, па теоријски, код пацијената са х ИТП се због ове чињенице може разматрати свакодневна супституција фолном киселином због метаболизма метил тетра хидрофолат редуктазе (МТХФР), али то свакако заслужује неко друго истраживање.

Када говоримо о параметрима антиоксидационе заштите, *GSH* и *КАТ* су статистички значајно виши у контролним групама него код пацијената са ИТП, док је супероксид дизмутаза (*SOD*) највиша код пацијената са нд ИТП, док у осталим групама нема значајне разлике (Табела 11.). Ово свакако потврђује и већина других истраживача који су се бавили овом темом, који сматрају да пацијенти са ИТП имају смањену антиоксидациону заштиту, због чега су код њих тромбоцити мета напада ОС и истраживачи који су користили антиоксиданте у терапији ИТП, иако су нажалост резултати неконзистентни [79, 80, 84, 85]. *Akbayram* и сарадници су показали да су укупни антиоксидациони капацитет и број тромбоцита били значајно нижи код деце са акутним и хроничним ИТП у поређењу са здравом контролом, док су прооксиданси, малондиалдехид (МДА), укупни оксидациони статус и индекс оксидационог стреса били значајно већи [79]. Сличне резултате је добила и друга група аутора, који су показали смањен укупни антиоксидациони капацитет, *КАТ* и *GSH* код пацијената са нд ИТП и х ИТП у поређењу са здравим контролама, као и веће вредности МДА [30]. Антиоксидациона терапија је побољшала број тромбоцита и степен крварења код пацијената са оба анализирана типа ИТП у студији *Elalfy* и коаутора, који су указали на позитивну корелацију броја тромбоцита са елементима антиоксидационог одбрамбеног система – глутатион пероксидазом, *SOD*, *КАТ*, *GSH* и укупним антиоксидационим капацитетом и негативну корелацију са прооксидансима – *NO*, оксидованим глутатионом, МДА и укупним оксидационим статусом [30]. Штавише, доказано је да је

чак и интрацелуларни антиоксидациони капацитет тромбоцита код одраслих пацијената са ИТП значајно смањен у поређењу са здравом контролом и пацијентима у ремисији [30].

Поређећи групе деце оболеле од ИТП у овој студији, *GSH*, *SOD* и *KAT* прате исту шему, повећавају се значајно на примењену терапију ив имуноглобулинама и системским кортикостероидима, док за разлику од *GSH* и *KAT* који се значајно смањују у фазама релапса у перзистентном облику болести, *SOD* значајно расте (Графикони 10. и 15.). То се може објаснити и најзначајнијом улогом O_2^- у ОС деце са ИТП, кога *SOD* у прављењу редокс баланса треба да детоксикuje, због чега вероватно њене вредности нагло расту и остају повишене дуже времена у односу на *GSH* и *KAT* [30, 78]. Насупрот томе, код пацијената са х ИТП сви параметри *ADS* су значајно снижени у односу на остале испитиване групе, али се њихове вредности практично не мењају, како на суплементацију аскорбинском киселином, тако и у фази релапса (Графикон 18.), што вероватно говори у прилог навике оболелих пацијената са х ИТП на снижен *ADS* и прављењу једне нове хомеостазе у том балансу *OC/ADS* [90]. Један од кључних проблема у лечењу ИТП свакако представља рефракторни ИТП на примењене терапијске процедуре, посебно х ИТП са хеморагијским синдромом [45], а чињеница да се антиоксидациони одбрамбени систем не побољшава код егзацербација х ИТП додатно потврђује најкомплицованији патолошко-физиолошки механизам код хроничне ИТП.

Убедљиво највише вредности параметара *ADS* имају пацијенти са нд ИТП који су доживели комплетну ремисију. За разлику од њих, пацијенти код којих болест дуже траје, имају иницијално значајно смањене антиоксидационе капацитете (Графикон 12.). Све то иде у прилог претходно изнетим чињеницама да када се ради о патогенези акутног и хроничног облика ИТП и оксидационог – антиоксидационог баланса, дефинитивно постоје озбиљне разлике [79, 88, 89]. Очигледно је да пацијенти са нд ИТП који имају изразито бурну иницијалну реакцију праћену озбиљним порастом параметара ОС, а са друге стране задовољавајућу *ADS*, имају добру прогнозу и брз опоравак. То је делимично потврђено и клиничким запажањима, јер је познато да пацијенти који иницијално имају јако низак број тромбоцита $<10 \times 10^9/l$ обично имају брзу регресију болести и добру реакцију на иницијалну терапију, за разлику од пацијената који иницијално имају број тромбоцита >30 , а посебно преко $>50 \times 10^9/l$, који су кандидати за развој хроничитета [45]. Наравно да се сви пацијенти не уклапају у описани шаблон, због чега је патогенеза ИТП врло компликована, посебно када су у питању пацијенти са идентичним лабораторијским испољавањем болести, а потпуно различитом клиничком експресијом.

Пацијенти са перзистентним обликом који су укључени у истраживање, по завршеној терапији неким од протокола системским кортикостероидима, су имали ниже вредности свих испитиваних параметара ОС, али то снижење није тако евидентно као након ив имуноглобулина у нд ИТП. Као и у случају нд ИТП, O_2^- , *TxA2* и *oxLDL* као повишени и *NO*, *PgI2* и *Arg* као снижени, се доминантно издвајају међу овим групама. Оно што је такође примећено је да у п ИТП терапија кортикостероидима нема великог утицаја на вредности АДМА, на остале параметре ОС реагује по истом шаблону као за нд ИТП, али насупрот томе, најупадљивије разлике у релапсу примећене су једино у вредностима *oxLDL*, док за остале параметре није установљена тако јака разлика. Слично је примећено и за релапс х ИТП, да се доминантно повећава *oxLDL* (Графикони 13. и 14., 16. и 17.). Ово може да имплицира још једну малу разлику у патофизиологији акутног и хроничног облика, јер је на основу ових резултата у акутном облику доминантна теорија повећаног ОС насталог током "респираторног праска" након инфекције и последично доминантне улоге O_2^- , док у хроничном облику,

у случају релапса доминира липидна пероксидација, уз највеће учешће *oxLDL*, али то до сада није доказано ни једним претходним истраживањем.

Када говоримо о параметрима антиоксидационе заштите код пацијенти са перзистентним обликом, рецидив болести је довео до значајно повишених вредности *SOD*, а значајно снижених *KAT*, али је већ код перзистентног облика уочљиво да се један од параметара антиоксидационе заштите (*GSH*) не мења значајније током егзацербације болести. Већ је напоменуто да то долази до изражаја у хроничном облику, где није регистровано да употреба аскорбинске киселине подиже нивое антиоксидационе заштите, са једне стране, док са друге, у рецидиву х ИТП такође не долази до значајнијих промена у антиоксидационој заштити код свих испитиваних параметара.

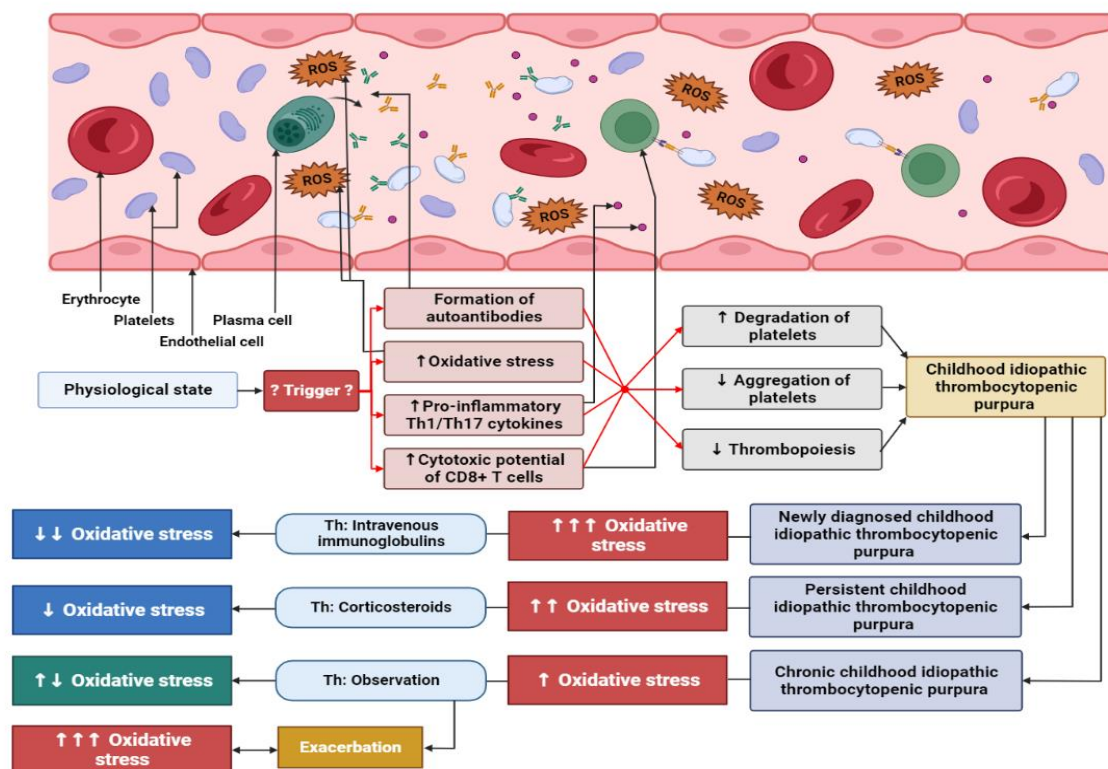
Оно што је врло битно нагласити је чињеница да се *OS* смањује, а *ADS* повећава до нормалних вредности по излечењу ИТП, с обзиром да између група здраве деце и деце које су излечене од ИТП, ни у једном испитиваном параметру нема значајније разлике (Табеле 9.–11.). Неки од кључних налаза ове студије су да су највеће вредности прооксиданата нађене у нд ИТП и да је најистакнутије смањење *OS* било након третмана ив имуноглобулинима, скромније, али ипак значајно смањење и након терапије кортикостероидима и да највеће вредности антиоксидационе заштите имају пацијенти са бурним имунолошким одговором, који релативно брзо уђу у ремисију, тако да не изненађује резултат да излечени пацијенти од ИТП имају у потпуности нормалан редокс баланс у организму. Без обзира што се ради о малом броју испитаника, према сазнањима аутора, ово је прва студија која је испитивала оксидациони статус код излечених пацијената од ИТП, посебно у дечијој популацији и представља добру основу за разумевање комплетног патофизиолошког механизма.

Имајући у виду релативно ограничен број студија које су се бавиле оксидационим стресом код ИТП у детињству, у овој студији су први пут истовремено посматране вредности биомаркера оксидационог стреса и параметара антиоксидационе заштите у различитим стадијумима болести, као и код излечених од ИТП. На шематском приказу (Шема 4.) приказан је упрошћени облик повезаности параметара оксидационог стреса и антиоксидационе заштите у патофизиологији различитих облика идиопатске тромбоцитопеничне пурпуре. Најважније предности ове студије су процена оксидационог стреса у различитим стадијумима ИТП код деце пре и после терапијских протокола. Најважније запажање у овом истраживању су највеће вредности прооксиданата код новодијагностикованих облика болести, као и драматичан пад након примене интравенских имуноглобулина. Још једно упечатљиво повећање биомаркера оксидационог стреса пронађено је код релапса перзистентног и хроничног облика ИТП. На основу наведених чињеница може се закључити да вредности оксидационог стреса значајно флукутирају у различитим стадијумима болести, као и да су у сагласности са клиничким приказом болести и бројем тромбоцита. Смањена моћ антиоксидационог одбрамбеног система код пацијената са ИТП сугерише на важност побољшања антиоксидационог капацитета, који се очигледно у хроничном облику не постиже применом препарата аскорбинске киселине. Све у свему, ови резултати се фокусирају на важност оксидационог стреса у патогенези ИТП у детињству. С друге стране, питање на које треба одговорити је да се идентификује извор оксидационог стреса код ових пацијената. Важно ограничење ове студије је број пацијената. Резултати до којих би се дошло праћењем већег броја пацијената, из различитих истраживачких центара, у дужем временском периоду, прецизније би указали на везу између оксидационог стреса и имуних поремећаја у оквиру ИТП у детињству.

Резултати ове студија свакако представљају снажну основу за разумевање варијација у редокс балансу у различитим облицима ИТП, али се посебна пажња мора

посветити х ИТП и чињеници да суплементација препаратом аскорбинске киселине није дала задовољавајуће и очекиване резултате, већ напротив, није имала никаквог утицаја на редокс баланс и клиничку презентацију хроничних пацијената. Произилази закључак да континуирана антиоксидативна терапија у свим фазама ИТП изгледа нема много смисла с обзиром да је редокс равнотежа побољшана тек након терапије ив имуноглобулинима у нд ИТП или терапије кортикостероидима у п ИТП, али се побољшава и у стабилном облику х ИТП. С друге стране, интензивна антиоксидативна терапија би опет теоријски могла да има протективне ефекте у ранијим фазама болести или у егзацербацији х ИТП, посебно имајући у виду да су друге терапијске опције скромне или да се размишља у правцу употребе неког другог антиоксидационог средства. Такође, мора се узети у обзир и примењена доза и дужина употребе суплемената. Свакако су јако оскудни подаци о ефектима суплементације антиоксидансима код пацијената који пате од ИТП. Показало се на примеру Ресвератрола, молекула са јаким антиоксидативним потенцијалом, да се обнавља дисбаланс *Th17/Treg* ћелија код пацијената са ИТП [122]. Експериментална истраживања код других аутоимуних болести указују на бољи успех комбиноване примене различитих антиоксиданата [123, 124].

Шема 4. Приказ патофизиолошког механизма различитих форми ИТП и повезаности са оксидационим стресом



5.6. Корелација параметара редокс баланса и основних клиничких и лабораторијских параметара код деце оболеле од ИТП

Није запажена статистички значајна разлика у параметрима ОС и ADS код пацијената са ИТП у свим групама када се узме у разматрање полна и узрасна подела. Постоје аутори који су доказали да је код одраслих жена са аутоимуном тромбоцитопенијом израженији оксидациони стрес него код оболелих мушкараца или здравих женских испитаника [86], али се то није потврдило у истраживањима других аутора [79, 80, 89, 90], као ни у овој студији. Пронађено је да је ОС код жена такође већи и у другим патолошким стањима, као што су коронарна и неуродегенеративна болест, карциноми, Паркинсонова и Алцхајмерова болести, а посебно код одређених аутоimunих болести. Доказано је жене имају јаче ћелијске и хуморалне имунолошке реакције у поређењу са мушкарцима, а полни хормони су вероватно делимично одговорни за већу појаву аутоimunих поремећаја код жена [87], тако да дефинитивно и полно специфичне разлике у патофизиологији ИТП треба узимати у разматрање. Изненађује резултат да нема разлике у параметрима ОС и ADS између различитих узрасних категорија, баш због претходно изнете чињенице да код адолесцената улогу добијају и полни хормони, као и неких претходних клиничких и искуствених сазнања да су адолесценти, посебно женског пола посебно склони развоју хроничног облика болести [45, 46].

Највише средње вредности O_2^- , H_2O_2 , TBARS, АДМА и *oxLDL*, а најниже *NO*, *PgI2* и *Arg* су забележене код свих пацијената са ИТП са тежом клиничком сликом (*BSS* 3 и 4), са нижим бројем тромбоцита $<20 \times 10^9/L$ и који имају хиперпродукцију мегакариоцита у цитолошком прегледу аспириата костне сржи, док са друге стране, поремећен редокс баланс не корелира значајније када је у питању средњи волумен тромбоцита (Табеле 13., 15. и 16.). Од параметара антиоксидационе заштите, само вредности *SOD* корелирају са тежином клиничке слике (степеном *BSS*), нижим бројем тромбоцита и хиперпродукцијом Мкц у костној сржи, док код осталих параметара *ADS* нису пронађене значајније разлике. Очигледно је да повећан ОС има велики утицај на тежину клиничке слике пацијената са ИТП, што је уосталом прва чињеница која је потврђена и у осталим радовима који су се бавили овом темом [30, 79, 89]. Бројна претходна истраживања су показала да је повишен ОС и смањен *ADS* дефинитивно укључен у компликовану патогенезу ИТП и да може корелирати са тежином болести и бројем тромбоцита [78–86, 88–91].

Оно што је већ напоменуто у овом раду је чињеница да пацијенти са новооткривеном ИТП који имају иницијално тежу клиничку слику и нижи број тромбоцита, уз додатак и хиперпродукције Мкц у костној сржи, имају бољу реакцију на примењену терапију и бржи клинички одговор. Изгледа да овакви пацијенти имају изразито бурну иницијалну реакцију праћену озбиљним порастом параметара ОС, а са друге стране имају задовољавајућу *ADS* и добар одговор костне сржи, због чега имају и бржи опоравак. То је добрим делом потврђено и клиничким запажањима, јер је познато да пацијенти који иницијално имају јако низак број тромбоцита $<10 \times 10^9/l$ и знаке хеморагијског синдрома, обично имају брзу регресију болести и добру реакцију на иницијалну терапију, за разлику од пацијената који иницијално имају број тромбоцита >30 , а посебно преко $>50 \times 10^9/l$, који су кандидати за развој хроничитета [45]. Наравно да се сви пацијенти не уклапају у описани шаблон, због чега је патогенеза ИТП врло компликована, посебно када су у питању пацијенти са идентичним лабораторијским испољавањем болести, а потпуно различитом клиничком експресијом. Слично томе, код пацијената са п ИТП и х ИТП, у фази релапса болести, када имају већи *BSS* и снижен број тромбоцита у крвној слици, очекивано долази до истих промена у вредностима параметара ОС.

Међутим, добијен је занимљив резултат да од параметара антиоксидационе заштите, само вредности *SOD* корелирају са тежином клиничке слике, тј. степеном крварења, бројем тромбоцита и хиперпродукцијом Мкц у костној сржи, док код осталих параметара нису пронађене значајније разлике. Већина истраживача који су се бавили овом темом је сложна у оцени да пацијенти са ИТП дефинитивно имају смањену антиоксидациону заштиту, због чега су код њих тромбоцити мета напада ОС, али међу истраживачима који су користили антиоксиданте у терапији ИТП (што је случај и са овом студијом) резултати су врло неконзистентни [79, 80, 84, 85]. Из ових резултата се може извући закључак да на степен крварења, тј. тежину клиничке слике више утиче количина створеног оксидационог стреса, а мање способност антиоксидационе заштите, што делимично и даје одговор на питање зашто је употреба антиоксиданаса код ИТП под великим знаком питања. Вероватније је да је у нд ИТП активност антиоксидационог система битнија него код перзистентног и хроничног облика болести, јер је већ апострофирано да се антиоксидациона заштита током трајања болести исцрпљује и да се у хроничној фази дефинитивно прави један нови редокс баланс и да *ADS* у хроничном облику више нема значајнију улогу у одбрани од прооксиданаса.

Такође, оно што се издваја као занимљив резултат је да није пронађена никаква статистички значајна разлика између средњих вредности параметара ОС и *ADS* са различитим волуменом тромбоцита. Очекивано је да компензаторним механизмом крупнији тромбоцити, који су и у метаболичком смислу и у процесу хемостазе активнији, покушавају својом величином да надокнаде недостатак у броју, који је обично најдоминантнији у акутној форми болести [4, 106]. Сигурно је да у каснијем току болести у томе учествују и други фактори, посебно микросредина костне сржи и да се временом у хроничном облику костна срж навикне да продукује нешто веће тромбоците. Али, очигледно је да на овај процес редокс баланс нема неког већег утицаја.

Поредећи параметре оксидационог стреса, установљено је да корелирају у обрнутој пропорцији са присуством других аутомуних болести код пацијената са ИТП. Највише средње вредности O_2^- , H_2O_2 , *TBARS*, АДМА и *oxLDL*, а најниже *NO*, *PgI2* и Арг су забележене код пацијената са ИТП који имају друге придружене аутоимуне болести, а занимљиво да пацијенти који су имали само ИТП имају више вредности ОС од пацијената са ИТП и присуством аутоантитела, без испољене аутоимуне болести (Табела 14.). Једини параметар који не показује значајнију корелацију је хомоцистеин. Слично је примећено и када су у питању параметри *ADS*. Најслабију антиоксидациону заштиту имају пацијенти са више аутоимуних болести, а занимљиво најјачу *ADS* пацијенти који болују од ИТП са присуством аутоантитела. Овакав налаз сугерише да присуство аутоантитела, без испољене болести дефинитивно помаже у стабилизацији ОС и повећању *ADS*, мада су до сада бројни истраживачи покушали да докуче праву улогу аутоантитела у ИТП, са врло контрадикторним резултатима [22, 23]. Очигледно је да само испољена друга аутоимуна болест утиче у великој мери на редокс баланс, а позитивност било ког аутоантитела, без испољене болести, представља једноставно само обичну лабораторијску потврду, али са дефинитивно позитивним ефектом на опоравак редокс статуса.

5.7. Корелација параметара редокс баланса и параметара теста кинетике тромбоцита код деце оболеле од х ИТП

Када се корелирају параметри ОС / ADS код пацијената са хроничним обликом ИТП са параметрима добијеним из теста кинетике тромбоцита, установили смо да параметри оксидационог стреса корелирају у обрнутој пропорцији са животним веком тромбоцита добијеним тестом кинетике (Графикони 19. и 20.), па тако највише средње вредности O_2^- , H_2O_2 , TBARS, TxA2, АДМА и oxLDL, а најниже NO, Pgl2 и Arg имају пацијенти са х ИТП којима тромбоцити живе краће од 1 дана, што је и очекивано, јер су у тој групи пацијенти са израженијим клиничким испољавањем болести и нижим бројем тромбоцита. Чак ни код хроничних пацијената са ИТП, где је верификована блага хиперхомицистеинемиа није нађено да се вредности хомоцистеина значајније разликују међу групама. У складу са претходним, регистровано је да највише вредности антиоксидационе заштите имају пацијенти са дужим животним веком тромбоцита, изузев SOD где је добијен обрнути однос, више вредности SOD код пацијената са краћим животним веком тромбоцита (Графикон 21.), што опет иде у прилог претходно изнетим чињеницама. С обзиром да се најтежи хронични пацијенти налазе у групи са мешовитом секвестрацијом тромбоцита (подједнако у јетри и слезини) очекивано је да ови пацијенти имају највише вредности O_2^- , H_2O_2 , TBARS, TxA2, АДМА и oxLDL, а најниже NO, Pgl2 и Arg у односу на пацијенте са доминантно хепатичном, а посебно са доминантном секвестрацијом тромбоцита у слезини (Графикон 22. и 23.). Слично као и у претходним случајевима вредности хомоцистеина се не разликују значајније. Са друге стране, највише вредности антиоксидационе заштите имају пацијенти са секвестрацијом доминантно у слезини, изузев SOD где су највише вредности добијене код пацијената са мешовитом секвестрацијом тромбоцита (Графикон 24.), што се уклапа у претходно установљен образац. За разлику од животног века и места секвестрације тромбоцита, индекс продукције не показује значајније корелације са параметрима ОС / ADS. Према сазнањима аутора, на репрезентативном узорку од 29 испитаника, ово је прва студија која се бавила повезаношћу теста кинетике тромбоцита и редокс баланса организма пацијената са хроничним обликом ИТП.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу анализе добијених резултата који су приказани у овој докторској дисертацији, дошли смо до следећих закључака:

- Повећан оксидациони стрес и смањена антиоксидациона заштита организма су дефинитивно укључени у компликовану патогенезу идиопатске тромбоцитопеничне пурпуре код деце, како за новодијагностиковане, тако и за хроничне форме
- Изражене су варијације редокс равнотеже између различитих форми ИТП и стања стабилне болести и егзацербације
- Изражене су варијације редокс равнотеже зависно од тежине клиничке слике и броја тромбоцита код оболелих од свих облика ИТП
- Најизраженије повећање оксидационог стреса и смањење антиоксидационе заштите примећено је код нд ИТП и у егзацербација како п ИТП, тако и у х ИТП
- Најизраженије повећање оксидационог стреса и смањење антиоксидационе заштите примећено је код пацијената са нижим бројем тромбоцита и израженијим степеном крварења код свих облика ИТП
- Стандардна терапија ив имуноглобулинима и системским кортикостероидима побољшава редокс равнотежу
- Терапија ив имуноглобулинима у нд ИТП побољшава редокс равнотежу у већој мери него терапија системским кортикостероидима у п ИТП
- Терапија *Deksametazon*-ом има већи ефекат на побољшање редокс равнотеже него терапија *Prednizon*-ом код пацијената са п ИТП
- Деца са нд ИТП која након иницијалног лечења доживе комплетну ремисију имају значајно израженију реакцију како у повећаном оксидационом, тако и смањеном антиоксидационом статусу у односу на децу чија болест прелази у хронични ток
- Деца са х ИТП имају најмању антиоксидациону заштиту у односу на остале испитиване групе, али се те вредности практично не мењају у фази релапса, што говори у прилог стварања једне нове хомеостазе у редокс равнотежи у х ИТП
- Суплементација антиоксидационим средством (препаратом аскорбинске киселине) се није показала као оправдаана код х ИТП пацијената
- Изражене су варијације редокс равнотеже зависно од места секвестрације тромбоцита из теста кинетике код оболелих од х ИТП
- Најизраженије повећање оксидационог стреса и смањење антиоксидационе заштите примећено је код пацијената са мешовитом секвестрацијом тромбоцита у јетри и у слезини код оболелих од х ИТП
- Суплементација Витамином Д се свакако препоручује код свих форми ИТП у дечијем узрасту
- Редокс равнотежа се враћа у нормалу по излечењу ИТП

7. ЛІТЕРАТУРА

1. White JG. Anatomy and structural organization of the platelet. In: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5th ed., Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, (eds) Philadelphia: JB Lippincot Co., 2006
2. George JN. Platelets. *Lancet*. 2000; 355: 1531–9.
3. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev*. 2017; 36(2):195–8.
4. Cramer EM, Fontenay M. Platelets: Structure related to function. In: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5th ed, Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, (eds) Philadelphia: JB Lippincot Co., 2006
5. Hamilos M, Petousis S, Parthenakis F. Interaction between platelets and endothelium: from pathophysiology to new therapeutic options. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2018; 8(5):568–80.
6. Ye, T., Shi, H., Phan-Thien, N. *et al*. The key events of thrombus formation: platelet adhesion and aggregation. *Biomech Model Mechanobiol*. 2020; 19: 943–55.
7. Hosseinzadegan H, Tafti DK. Mechanisms of platelet activation, adhesion and aggregation. *Thromb Haemost Res*. 2017; 1(2):1008.
8. Long MW, Hoffman R. Thrombocytopoiesis. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al. Hematology Basic Principles and Practice. 4th ed. Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone, 2005: 303–20.
9. Zini G, Viscovo M. Cytomorphology of normal, reactive, dysmorphic, and dysplastic megakaryocytes in bone marrow aspirates. *Int J Lab Hematol*. 2021; 43(1): 23–8.
10. Behrens K, Alexander WS. Cytokine control of megakaryopoiesis. *Growth Factors*. 2018; 36(3-4):89–103
11. Scandola C, Erhardt M, Rinckel JY, Proamer F, Gachet C, Eckly A. Use of electron microscopy to study megakaryocytes. *Platelets*. 2020; 31(5): 589–8.
12. Langlois GP, Craig M, Humphries AR, et al. Normal and pathological dynamics of platelets in humans. *J Math Biol*. 2017; 75(6-7): 1411–62.
13. Vinholt PJ. The role of platelets in bleeding in patients with thrombocytopenia and hematological disease. *Clin Chem Lab Med*. 2019; 57(12): 1808–17.
14. LeVine DN, Brooks MB. Immune thrombocytopenia (ITP): Pathophysiology update and diagnostic dilemmas. *Vet Clin Pathol*. 2019; 48(1): 17–28.
15. Nurden AT, Nurden P. Inherited thrombocytopenias: history, advances and perspectives. *Haematologica*. 2020; 105(8): 2004–19.
16. Liebman HA. Thrombocytopenia in cancer patients. *Thromb Res*. 2014; 133(2): S63–9.
17. Pizzi M, Friziero A, Vianello F, et al. Histology of the spleen in immune thrombocytopenia: clinical-pathological characterization and prognostic implications. *Eur J Haematol*. 2021; 106(2): 281–9.
18. Zufferey A, Kapur R, Semple JW. Pathogenesis and therapeutic mechanisms in immune thrombocytopenia (ITP). *J Clin Med*. 2017; 6(2): 16.
19. Sandal R, Mishra K, Jandial A, Sahu KK, Siddiqui AD. Update on diagnosis and treatment of immune thrombocytopenia. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2021; 14(5): 553–8.
20. Schmidt D, Lakerveld A, Heitink-Pollé K, et al. Anti-platelet antibody immunoassays in childhood immune thrombocytopenia: a systematic review. *Vox Sang*. 2020; 115(4): 323–33.
21. Nagler M, Keller P, Siegrist D, Alberio L. A case of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: simple recognition of an underdiagnosed and misleading phenomenon. *BMC Clin Pathol*. 2014; 14: 19.

22. Zheng SS, Perdomo JS, Ahmadi Z, Chong BH. Indirect detection of anti-platelet antibodies in immune thrombocytopenia. *Pathology*. 2021; 53(6): 759–62.
23. Schmidt DE, Heitink-Polle KMJ, Porcelijn L, et al. Anti-platelet antibodies in childhood immune thrombocytopenia: Prevalence and prognostic implications. *J Thromb Haemost*. 2020; 18(5): 1210–20.
24. Kim TO, Despotovic JM. Primary and Secondary Immune Cytopenias: Evaluation and Treatment Approach in Children. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2019; 33(3): 489–506.
25. Neunert C, Terrell RD, Arnold MD, et al. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. *Blood Adv*. 2019; 3(23): 3829–66.
26. Remiker A, Neunert C. Splenectomy for immune thrombocytopenia: the evolution and preservation of treatment. *Haematologica*. 2020; 105(11): 2507–9.
27. Gözmen S, Karapnar TH, Tüfekçi Ö, et al. B-cell-activating factor, a proliferation inducing ligand and co-stimulatory molecules in the pathogenesis of immune thrombocytopenia in childhood. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2016; 27(5): 494–9.
28. Vrbensky JR, Arnold DM, Kelton JG, et al. Increased cytotoxic potential of CD8⁺ T cells in immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2020; 188(5): e72–e76.
29. Li S, Shao J, Xia M, Zhang N, Yang J, Li H, Jiang H. Thrombopoietin and its receptor expression in pediatric patients with chronic immune thrombocytopenia. *Hematology*. 2018; 23(7): 433–8.
30. Elalfy MS, Elhenawy YI, Deifalla S, Hegazy M, Sabra A, Abdelaziz Y. Oxidant/antioxidant status in children and adolescents with immune thrombocytopenia (ITP) and the role of an adjuvant antioxidant therapy. *Pediatr Blood Cancer*. 2015; 62(5): 830–7.
31. Lee A, Hong J, Chung H, et al. Helicobacter pylori eradication affects platelet count recovery in immune thrombocytopenia. *Sci Rep*. 2020; 10(1): 9370.
32. Weycker D, Hanau A, Hatfield M, et al. Primary immune thrombocytopenia in US clinical practice: incidence and healthcare burden in first 12 months following diagnosis. *J Med Econ*. 2020; 23(2): 184–92.
33. Kühne T. Diagnosis and management of immune thrombocytopenia in childhood. *Hamostaseologie*. 2017; 37(1): 36–44.
34. Morin E, Sadarangani M. Recurrent immune thrombocytopenia following different vaccines. *BMJ Case Rep*. 2019; 12(9): e231260.
35. Singh G, Bansal D, Wright NAM. Immune Thrombocytopenia in Children: Consensus and Controversies. *Indian J Pediatr*. 2020; 87(2): 150–57.
36. Kohli R, Chaturvedi S. Epidemiology and Clinical Manifestations of Immune Thrombocytopenia. *Hamostaseologie*. 2019; 39(3): 238–49.
37. Provan D, Arnold DM, Bussel JB, et al. Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood Adv*. 2019; 3(22): 3780–3817.
38. Terrell DR, Neunert CE, Cooper N, et al. Immune Thrombocytopenia (ITP): Current Limitations in Patient Management. *Medicina (Kaunas)*. 2020; 56(12): 667.
39. Lassandro G, Carriero F, Palmieri, et al. Serum Vitamin D Levels in Children with Immune Thrombocytopenia. *Endocr Metab Immune Disord Drug TApzets*. 2020; 20(2): 221–6.
40. Shaheen IA, Aboukhalil R, Abulata N, Abdel-Raouf R, Meligy B, Abdel-Dayem O. Vitamin D Insufficiency is Not Associated With Pediatric and Adolescent Immune Thrombocytopenia: A Study in Conjunction With its Receptor Genetic Polymorphisms. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2021; 43(1): e1–e6.
41. Buchanan RG, Adix L. Grading of hemorrhage in children with idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr*. 2002; 141(5): 683–8.

42. Rodeghiero F, Michel M, Gernsheimer T, et al. Standardization of bleeding assessment in immune thrombocytopenia: report from the International Working Group. *Blood*. 2013; 121(14): 2596–606.
43. Heitink-Pollé KMJ, Uiterwaal CSPM, Porcelijn L, et al; TIKI Investigators. Intravenous immunoglobulin vs observation in childhood immune thrombocytopenia: a randomized controlled trial. *Blood*. 2018; 132(9): 883–91.
44. Bennett CM, Neunert C, Grace RF, et al. Predictors of remission in children with newly diagnosed immune thrombocytopenia: Data from the Intercontinental Cooperative ITP Study Group Registry II participants. *Pediatr Blood Cancer*. 2018; 65(10). e26736
45. Güngör T, Arman Bilir Ö, Koşan Çulha V, et al. Retrospective evaluation of children with immune thrombocytopenic purpura and factors contributing to chronicity. *Pediatr Neonatol*. 2019; 60(4): 411–16.
46. Jaime-Pérez JC, Aguilar-Calderón P, Jiménez-Castillo RA, Ramos-Dávila EM, Salazar-Cavazos L, Gómez-Almaguer D. Treatment outcomes and chronicity predictors for primary immune thrombocytopenia: 10-year data from an academic center. *Ann Hematol*. 2020; 99(11): 2513–20.
47. Ma J, Fu LL, Chen ZP, et al. Clinical study of pulsed high-dose dexamethasone treatment in 38 children with primary immune thrombocytopenic purpura. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2016; 37(10): 912–15.
48. Maruta M, Tsujimoto Y, Tsutsumi Y. High-dose dexamethasone as the first-line treatment in children with primary immune thrombocytopenia? *Int J Hematol*. 2021 Jul; 114(1): 146.
49. Despotovic JM, Grimes AB. Pediatric ITP: is it different from adult ITP? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2018 Nov 30; 2018(1): 405–11.
50. Schifferli A, Holbro A, Chitlur M, et al. Intercontinental Cooperative ITP Study Group (ICIS). A comparative prospective observational study of children and adults with immune thrombocytopenia: 2-year follow-up. *Am J Hematol*. 2018; 93(6): 751–59.
51. Saeidi S, Jaseb K, Asnafi AA, et al. Immune thrombocytopenic purpura in children and adults: a comparative retrospective study in Iran. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2014; 8(3): 30–36.
52. Grace RF, Despotovic JM, Bennett CM, et al. Physician decision making in selection of second-line treatments in immune thrombocytopenia in children. *Am J Hematol*. 2018; 93(7): 882-8.
53. DeSouza S, Angelini D. Updated guidelines for immune thrombocytopenic purpura: Expanded management options. *Cleve Clin J Med*. 2021; 88(12): 664–8.
54. Depré F, Aboud N, Mayer B, Salama A. Efficacy and tolerability of old and new drugs used in the treatment of immune thrombocytopenia: Results from a long-term observation in clinical practice. *PLoS One*. 2018; 13(6):e0198184.
55. Ducassou S, Gourdonneau A, Fernandes H, et al. Second-line treatment trends and long-term outcomes of 392 children with chronic immune thrombocytopenic purpura: the French experience over the past 25 years. *Br J Haematol*. 2020; 189(5): 931–42.
56. Vianelli N, Galli M, de Vivo A, et al. Efficacy and safety of splenectomy in immune thrombocytopenic purpura: long-term results of 402 cases. *Haematologica*. 2005; 90(1): 72–7.
57. Todorović-Tirnanić M, Obradović V, Rolović Z, et al. Prediction of the splenectomy efficacy in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Glas Srp Akad Nauka Med*. 2005; (48):119–35.
58. Woo JH, Park SH, Park YK, et al. Postsplenectomy recurrence of thrombocytopenia with an accessory spleen. *Korean J Intern Med*. 2004; 19(3): 199–201.

59. Shimano KA, Neunert C, Bussel JB, et al. Quality of life is an important indication for second-line treatment in children with immune thrombocytopenia. *Pediatr Blood Cancer*. 2021; 68(6): e29023.
60. Panigrahi A, Clark A, Myers J, Raj A. A novel immunomodulatory treatment involving mycophenolate mofetil and corticosteroids for pediatric autoimmune cytopenias. *Pediatr Blood Cancer*. 2017; 64(2): 287–93.
61. Mousavi-Hasanzadeh M, Bagheri B, Mehrabi S, Eghbali A, Eghbali A. Sirolimus versus cyclosporine for the treatment of pediatric chronic immune thrombocytopenia: A randomized blinded trial. *Int Immunopharmacol*. 2020; 88: 106895.
62. Gurlek Gokcebay D, Guzelkucuk Z, Yarali N. Long-term efficiency of rituximab therapy in children with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Transfus Apher Sci*. 2018; 57(3): 416–17.
63. Ayad N, Grace RF, Al-Samkari H. Thrombopoietin receptor agonists and rituximab for treatment of pediatric immune thrombocytopenia: A systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *Pediatr Blood Cancer*. 2021; e29447.
64. Tumaini Massaro J, Chen Y, Ke Z. Efficacy and safety of thrombopoietin receptor agonists in children with chronic immune thrombocytopenic purpura: meta-analysis. *Platelets*. 2019; 30(7): 828–5.
65. Neunert CE, Rose MJ. Romiplostim for the management of pediatric immune thrombocytopenia: drug development and current practice. *Blood Adv*. 2019; 3(12): 1907–15.
66. Ahmed HAW, Masoud AT, Han J, et al. Eltrombopag Effectiveness and Tolerability in Chronic Immune Thrombocytopenia: A Meta-Analysis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2021; 27: 10760296211005555.
67. Kim TO, Despotovic J, Lambert MP. Eltrombopag for use in children with immune thrombocytopenia. *Blood Adv*. 2018; 2(4): 454–61.
68. Paik J. Fostamatinib: A Review in Chronic Immune Thrombocytopenia. *Drugs*. 2021; 81(8): 935–43.
69. Todorović-Tirnanić M, Obradović V, Rolović Z, et al. Prediction of the splenectomy efficacy in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Glas Srp Akad Nauka Med*. 2005; (48): 119–35.
70. Palandri F, Polverelli N, Catani L, et al. The choice of second-line therapy in steroid-resistant immune thrombocytopenia: role of platelet kinetics in a single-centre long-term study. *Am J Hematol*. 2014; 89(11): 1047–50.
71. Navez J, Hubert C, Gigot JF, et al. Does the site of platelet sequestration predict the response to splenectomy in adult patients with immune thrombocytopenic purpura? *Platelets*. 2015; 26(6): 573–6.
72. Sarpatwari A, Provan D, Erqou S, Sobnack R, David Tai FW, Newland AC. Autologous 111 In-labelled platelet sequestration studies in patients with primary immune thrombocytopenia (ITP) prior to splenectomy: a report from the United Kingdom ITP Registry. *Br J Haematol*. 2010; 151(5): 477–87.
73. Meyer O, Herzig E, Salama A. Platelet Kinetics in Idiopathic Thrombocytopenic Purpura Patients Treated with Thrombopoietin Receptor Agonists. *Transfus Med Hemother*. 2012; 39(1): 5–8.
74. Zheng X, Sawalha AH. The Role of Oxidative Stress in Epigenetic Changes Underlying Autoimmunity. *Antioxid Redox Signal*. 2022; 36(7-9): 423–40.
75. Yang ML, Doyle HA, Clarke SG, Herold KC, Mamula MJ. Oxidative Modifications in Tissue Pathology and Autoimmune Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2018; 29(14): 1415–31.

76. Pearson JD, Mason JC. Reactive oxygen species as drivers of autoimmune pathology: an Introduction to Special Issue "Oxidative stress and altered redox signalling in autoimmune and connective tissue diseases". *Free Radic Biol Med.* 2018; 125: 1–2.
77. Ramani S, Pathak A, Dalal V, Paul A, Biswas S. Oxidative Stress in Autoimmune Diseases: An Under Dealt Malice. *Curr Protein Pept Sci.* 2020; 21(6): 611–21.
78. Zhang B, Zehnder JL. Oxidative stress and immune thrombocytopenia. *Semin Hematol* 2013; 50: e1-4.
79. Akbayram S, Doğan M, Akgün C, et al. The association of oxidant status and antioxidant capacity in children with acute and chronic ITP. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2010; 32(4): 277 –81.
80. Kamhieh-Milz J, Bal G, Sterzer V, Kamhieh-Milz S, Arbach O, Salama A. Reduced antioxidant capacities in platelets from patients with autoimmune thrombocytopenia purpura (ITP). *Platelets.* 2012; 23(3): 184–94.
81. Ohno Y, Kanoh T, Uchino H. Idiopathic thrombocytopenic purpura with defective oxidative metabolism of neutrophils. *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi.* 1984; 47(6): 1257–64.
82. Amendola G, Cirillo G, Spiezie M, Di Concilio R, Rolando P. Treatment of childhood chronic idiopathic thrombocytopenic purpura with ascorbate. *Clin Pediatr (Phila).* 1995; 34(5): 268–70.
83. Brox AG, Howson-Jan K, Fauser AA. Treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura with ascorbate. *Br J Haematol.* 1988; 70(3): 341–4.
84. Polat G, Tamer L, Tanriverdi K, Gürkan E, Baslamisli F, Atik U. Levels of malondialdehyde, glutathione and ascorbic acid in idiopathic thrombocytopenic purpura. *East Afr Med J.* 2002; 79(8): 446–9.
85. Qin P, Wei Y, Hou M, Zhao C, Shen Z. A multicenter clinical trial of caffeic acid tablet in treatment of 103 primary immune thrombocytopenia patients. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2015; 36(2): 103–6.
86. Kamhieh-Milz J, Salama A. Oxidative stress is predominant in female but not in male patients with autoimmune thrombocytopenia. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014: 720347.
87. Pan Z, Chang C. Gender and the regulation of longevity: implications for autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2012; 11(6-7): A393–403.
88. Zhang B, Lo C, Shen L, et al. The role of vanin-1 and oxidative stress-related pathways in distinguishing acute and chronic pediatric ITP. *Blood.* 2011; 117(17): 4569–79.
89. Kar YD, Özdemir ZC, Bör Ö. Thiol / disulfide balance and oxidative stress parameters in pediatric patients diagnosed with acute and chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Turk J Pediatr.* 2021; 63(6): 962–69.
90. Jin CQ, Dong HX, Cheng PP, Zhou JW, Zheng BY, Liu F. Antioxidant status and oxidative stress in patients with chronic ITP. *Scand J Immunol.* 2013; 77(6): 482–7.
91. Wang TL, Guo DH, Bai Y, Wen K, Han WY, Wang R. Thrombocytopenia in Patients Receiving Prolonged Linezolid May be Caused by Oxidative Stress. *Clin Drug Investig.* 2016; 36(1): 67–75.
92. Mannucci C, Casciaro M, Sorbara EE, et al. Nutraceuticals against Oxidative Stress in Autoimmune Disorders. *Antioxidants (Basel).* 2021; 10(2): 261.
93. Wang S, Liu Y, Li G, Feng Q, Hou M, Peng J. Reduced intracellular antioxidant capacity in platelets contributes to primary immune thrombocytopenia via ROS-NLRP3-caspase-1 pathway. *Thromb Res.* 2021; 199: 1–9.
94. Vrbensky JR, Nazy I, Toltl LJ, et al. Megakaryocyte apoptosis in immune thrombocytopenia. *Platelets.* 2018; 29(7): 729-732.

95. Miao W, Song B, Shi B, et al. Immune Thrombocytopenia Plasma-Derived Exosomes Impaired Megakaryocyte and Platelet Production through an Apoptosis Pathway. *Thromb Haemost.* 2021; 121(4): 495-505.
96. Thachil J. Nitric oxide in immune thrombocytopenic purpura. *Hematology.* 2009; 14(1): 59–62.
97. Shruthi S, Thabah MM, Zachariah B, Negi VS. Association of Oxidative Stress with Disease Activity and Damage in Systemic Lupus Erythematosus: A Cross Sectional Study from a Tertiary Care Centre in Southern India. *Indian J Clin Biochem.* 2021; 36(2): 185–93.
98. Araujo CF, Lacerda MV, Abdalla DS, Lima ES. The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(6): 517–21.
99. Al-Shehri SS. Reactive oxygen and nitrogen species and innate immune response. *Biochimie.* 2021; 181: 52–64.
100. Barbieri SS, Petrucci G, Tarantino E, et al. Abnormal megakaryopoiesis and platelet function in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Thromb Haemost.* 2015; 114(6): 1218–29.
101. Tao J, Yang M, Chen Z, Zhang WH, Zhang XL, Yang RC. The role of DNA methylation in the pathogenesis of adult idiopathic thrombocytopenic purpura. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2010; 49(3): 208–12.
102. El-Shiekh EH, Bessa SS, Abdou SM, El-Refaey WA. Role of DNA methyltransferase 3A mRNA expression in Egyptian patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Lab Hematol.* 2012; 34(4): 369–76.
103. Kamioka PE, Liphaut BL, Beatrice JM, et al. Latent and Overt Polyautoimmunity in Children and Adolescents with Immune Thrombocytopenia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2020; 42(7): e606–e609.
104. Lee AC. Is There a Need to Look for Antithyroid Antibodies in Children With Immune Thrombocytopenia? *J Pediatr Hematol Oncol.* 2021; 43(8): e1248.
105. Chotsampancharoen T, Sripornsawan P, Duangchoo S, Wongchanchailert M, McNeil E. Clinical outcome of childhood chronic immune thrombocytopenia: A 38-year experience from a single tertiary center in Thailand. *Pediatr Blood Cancer.* 2017; 64(11). doi: 10.1002/pbc.26598. Epub 2017 Apr 28.
106. Lee YK, Yoon HS, Lee EH, Cho SY. Can we Predict the Clinical Course of Immune Thrombocytopenia in Children by The Mean Platelet Volume? A Preliminary Study. *Clin Lab.* 2021; 67(3). doi: 10.7754/Clin.Lab.2020.200715.
107. Adly AA, Ragab IA, Ismail EA, Farahat MM. Evaluation of the immature platelet fraction in the diagnosis and prognosis of childhood immune thrombocytopenia. *Platelets.* 2015; 26(7): 645–50.
108. Zhou LY, Zhang Z, Tao Y, et al. Correlation between clinical outcome of 115 patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and megakaryocyte counts in bone marrow biopsy. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2011 Feb; 19(1): 202–6.
109. Parodi E, Russo G, Farruggia P, et al. Management strategies for newly diagnosed immune thrombocytopenia in Italian AIEOP Centres: do we overtreat? Data from a multicentre, prospective cohort study. *Blood Transfus.* 2020; 18(5): 396–405.
110. Bissinger R, Bhuyan AAM, Qadri SM, Lang F. Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. *FEBS J.* 2019; 286(5): 826–54.
111. Liang Y, Zhou R, Liu X, et al. Leukemia Inhibitory Factor Facilitates Self-Renewal and Differentiation and Attenuates Oxidative Stress of BMSCs by Activating PI3K/AKT Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2022; 2022: 5772509.

112. Xiong S, Chng WJ, Zhou J. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a dynamic duo in multiple myeloma. *Cell Mol Life Sci.* 2021; 78(8): 3883–3906.
113. Jafri F, Seong G, Jang T, Cimpeanu E, Poplawska M, Dutta D, Lim SH. L-glutamine for sickle cell disease: more than reducing redox. *Ann Hematol.* 2022; 101(8): 1645–54.
114. Hirsch RE, Sibmooh N, Fucharoen S, Friedman JM. HbE/ β -Thalassemia and Oxidative Stress: The Key to Pathophysiological Mechanisms and Novel Therapeutics. *Antioxid Redox Signal.* 2017; 26(14): 794–813.
115. Voskou S, Aslan M, Fanis P, Phylactides M, Kleanthous M. Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. *Redox Biol.* 2015; 6: 226–39.
116. Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Prada GI. Oxidized LDL and NO synthesis – Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mech Ageing Dev.* 2015; 151: 101–13.
117. Cura M, Koç A, Aksoy N, Özdemir ZC. Effect of short-term, high-dose methylprednisolone on oxidative stress in children with acute immune thrombocytopenia. *Blood Res.* 2016; 51(4): 261–7.
118. Barros CDS, Livramento JB, Mouro MG, Higa EMS, Moraes CT, Tengan CH. L-Aprinine reduces nitro-oxidative stress in cultured cells with mitochondrial deficiency. *Nutrients.* 2021; 13(2): 534.
119. Hanusch B, Sinnigen K, Brinkmann F, et al. Characterization of the L-aprinine/nitric oxide pathway and oxidative stress in pediatric patients with atopic diseases. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(4): 2136.
120. Armstrong PC, Truss NJ, Ali FY, et al. Aspirin and the in vitro linear relationship between thromboxane A2-mediated platelet aggregation and platelet production of thromboxane A2. *J Thromb Haemost.* 2008; 6(11): 1933–43.
121. Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol.* 2008; 93(1): 141–7.
122. Guo NH, Fu X, Zi FM, Song Y, Wang S, Cheng J. The potential therapeutic benefit of Resveratrol on Th17/Treg imbalance in immune thrombocytopenic purpura. *Int Immunopharmacol.* 2019; 73: 181–92.
123. Navidhamidi M, Nazari A, Dehghan S, Ebrahimpour A, Nasrnezhad R, Pourabdolhossein F. Therapeutic potential of combined therapy of vitamin A and vitamin C in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats. *Mol Neurobiol.* 2022; 59(4): 2328–47.
124. Mannucci C, Casciaro M, Sorbara EE, et al. Nutraceuticals against oxidative stress in autoimmune disorders. *Antioxidants (Basel).* 2021; 10(2): 261.

8. СКРАЋЕНИЦЕ

	Енглески	Српски	Значење
GP	Glycoprotein		Гликопротеин
Мкц		Мегакариоцит	
TGF-β	transforming growth factor-beta		Трансформишући фактор раста бета
ТПО		Тромбопоетин	
ЕДТА		етилен ди аминокетарат	
IgM	Immunoglobulin M		Имуноглобулин М
IgG	Immunoglobulin G		Имуноглобулин Г
ИТП		Имуна (идиопатска) тромбоцитопенијска пурпура	
NK	Natural killer		Ћелије убице
ANA	Antinuclear antibodies		Антинуклеарна антитела
LAC	Lupus anticoagulant antibodies		Антитела на лупус антикоагуланс
PT	Prothrombin time		Протромбинско време
aPTT	Activated partial thromboplastin time		Активирано парцијално тромбопластинско време
INR	International normalized ratio		Интернационално стандардизовани однос за адекватан приказ протромбинског времена
FT4	Free thyroxin		Слободни тироксин
TSH	Thyroid-stimulating hormone		Тиреостимулишући хормон
antiTPO	Anti-thyroid peroxidase antibodies		Антитела против тироидне пероксидазе
antiTG	Anti-thyroglobulin antibodies		Антитела против тиреоглобулина
ОРЛ		Оториноларинголог	
РТГ		Рентгенграфија	
IgA	Immunoglobulin A		Имуноглобулин А
BSS	Bleeding severity score		Скор за процену крварења
ив		интравенски	
РхД		Резус фактор Д антиген	

TM		Телесна маса
ДНК		Дезоксирибонуклеинска киселина
OC		Оксидациони стрес
ROS	Reactive Oxygen Species	Реактивна кисеонична једињења
ADS	Antioxydant Defence System	Антиоксидациони одбрамбени систем
NO	Nitrogen oxid	Азот моноксид
Arg		Аргинин
АДМА		Асиметрични диметил аргинин
oxLDL	Oxidized low-density lipoprotein	Оксидовани липопротеин мале молекулске масе
O₂⁻	Superoxide radical	Супероксид анјон радикал
H₂O₂	Hydrogen peroxide	Водоник пероксид
SOD	Superoxide dismutase	Супероксид дизмутаза
GSH	Glutathione	Редуковани глутатион
КАТ		Каталаза
PgI₂	Prostaglandin I ₂	Простациклин
TxA₂	Thromboxane A ₂	Тромбоксан А ₂
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances	Индекс липидне пероксидације
НСУ	Homocysteine	Хомоцистеин
нд ИТП		Новооткривена ИТП
п ИТП		Перзистентна ИТП
х ИТП		Хронична ИТП
и ИТП		Излечени од ИТП
АЛТ		Аланин аминотрансфераза
АСТ		Аспартат аминотрансфераза
ЛДХ		Лактична дехидрогеназа
MDA	Malon dialdehyde	Малонил диалдехид
MPV	Mean platelet volume	Средњи волумен тромбоцита
УКЦ		Универзитетски клинички центар

ККС	Комплетна крвна слика
СВ	Средња вредност
СД	Стандардна девијација
ПХ	Патохистолошки

БИОГРАФИЈА

Раша (Хајриз) Медовић, педијатар, субспецијалиста хематолог, шеф одсека хематологије, одељења хематоонкологије, Педијатријске клинике, Универзитетског клиничког центра у Крагујевцу, асистент на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Рођен је 11.11.1985. године у Крагујевцу, где је завршио основну школу као ђак генерације и средњу медицинску школу са одличним успехом. Диплому доктора медицине на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу стекао је у марту 2011. године, са просечном оценом 9,65. Од августа 2012. године запослен на Педијатријској клиници, Универзитетског клиничког центра Крагујевац. Звање специјалисте педијатрије је стекао јула 2017. године, а звање субспецијалисте хематолога априла 2022. године. Од јуна 2020. године учествује у извођењу наставе на Факултету медицинских наука као асистент на предмету Педијатрија.

Аутор је или коаутор у укупно 55 научно истраживачких радова који су објављени у стручним часописима и зборницима конгреса, како међународног, тако и националног значаја. Од тога је 25 стручно–научних радова публиковано у целини, од чега је у 6 радова први аутор, а у 8 кореспондирајући аутор. Има укупно 13 радова на *SCI* листи. Рецензент часописа *Serbian Journal for Experimental and Clinical Research*.

Члан Етичког одбора Универзитетског клиничког центра Крагујевац од јануара 2021. године. Члан Управе Педијатријске школе, Удружења педијатара Србије од октобра 2022. године.

Тренутно учесник два јуниор пројекта на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, а током 2011. и 2012. године учесник научно–истраживачког пројекта Министарства просвете и науке Републике Србије, као корисник стипендије за најбоље студенте докторских академских студија.

Ожењен, отац два женска детета.

Најзначајније референце:

1. **Medovic R**, Srejovic I, Medovic M, Milosavljevic I, Nikolic M, Stojanovic A, Kuzmanovic M, Djurdjevic P, Bolevich S, Fisenko V, Jakovljevic V, Igrutinovic Z. *Variations of redox balance in different stages of childhood immune thrombocytopenic purpura*. *Thromb Haemost.* 2023; in print DOI: 10.1055/s-0043-1772683

2. **Medovic R**, Medovic M, Igrutinovic Z, Vlahovic A, Kostic G, Ristic G, Vuletic B, Markovic S. *Acute hemorrhagic edema of infancy – is that really a mild, benign disease?* *Turk J Pediatr.* 2021; 63(1): 141-148. DOI: 10.24953/turkyped.2021.01.017

3. **Medović R**, Igrutinović Z, Radojević–Marjanović R, Marković S, Rašković Z, Simović A, Nestorović–Tanasković J, Radovanović M, Vuletić B. *Clinical and laboratory differences between Epstein–Barr and Cytomegalovirus infectious mononucleosis in children*. *Srp Arh Celok Lek.* 2016; 144(1-2): 56–62. DOI: 10.2298/SARH1602056M

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

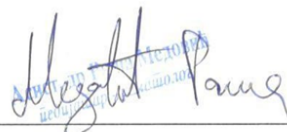
"Оксидациони стрес и антиоксидациони статус код деце оболеле од имунске тромбоцитопеничне пурпуре"

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 21. 08. 2023. године,



потпис аутора

Образац 2

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

**"Оксидациони стрес и антиоксидациони статус код деце оболеле од
имунске тромбоцитопеничне пурпуре"** истоветне.

У Крагујевцу, 21.08.2023. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Медовић Раша

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

"Оксидациони стрес и антиоксидациони статус код деце оболеле од имунске тромбоцитопеничне пурпуре"

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 21. 08. 2023. године,


пoчис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org/>