

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

RENATA KOVAČIČ

**SINTEZNI RETIKULOCITNI INDEKS
KOT POKAZATELJ AKTIVNOSTI KOSTNEGA MOZGA**

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

RENATA KOVAČIČ

**SINTEZNI RETIKULOCITNI INDEKS
KOT POKAZATELJ AKTIVNOSTI KOSTNEGA MOZGA
RETICULOCYTE PRODUCTION INDEX AS INDICATOR
OF BONE MARROW ACTIVITY**

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. Analize so bile narejene v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm. in vsem, ki ste z nasveti kakorkoli pripomogli pri izdelavi mojega diplomskega dela.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Renata Kovačič

Ljubljana, marec 2011

Predsednica diplomske komisije: izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

KAZALO

1	UVOD	1
1.1	ERITROPOEZA.....	1
1.2	ANEMIJE	2
1.2.1	MIKROCITNE ANEMIJE.....	3
1.2.2	MAKROCITNE ANEMIJE	4
1.2.3	NORMOCITNE ANEMIJE	6
1.3	DIAGNOSTIKA ANEMIJ	10
1.3.1	KRVNA SLIKA	10
1.3.2	TESTI ZA DOLOČANJE OSKRBE Z ŽELEZOM.....	13
1.3.3	PREGLED KOSTNEGA MOZGA	14
1.3.4	LABORATORIJSKE PREISKAVE ZA DOKAZOVANJE MEGALOBLASTNE ANEMIJE	14
1.3.5	LABORATORIJSKE PREISKAVE ZA DOKAZOVANJE HEMOLIZE	15
1.3.6	DIFERENCIALNA DIAGNOSTIKA	16
1.4	ZDRAVLJENJE ANEMIJ	19
1.5	VREDNOTENJE AKTIVNOSTI KOSTNEGA MOZGA	22
2	NAMEN DELA	25
3	MATERIALI IN METODE	26
3.1	HEMATOLOŠKI ANALIZATOR	26
3.2	IZRAČUN SINTEZNEGA RETIKULOCITNEGA INDEKSA (RPI)	30
3.3	STATISTIČNA ANALIZA	31
4	REZULTATI	33
4.1	OPIS SKUPIN.....	33
4.2	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	40
4.3	KORELACIJA MED RPI IN ABSOLUTNIM ŠTEVILOM RETIKULOCITOV 45	
5	RAZPRAVA	48
6	SKLEP	51
7	LITERATURA	52

KAZALO SLIK

SLIKA 1: DOZOREVANJE CELIC RDEČE VRSTE	1
SLIKA 2: PRISTOP K BOLNIKU Z MIKROCITNO ANEMIJO.....	17
SLIKA 3: PRISTOP K BOLNIKU Z NORMOCITNO ANEMIJO	18
SLIKA 4: PRISTOP K BOLNIKU Z MAKROCITNO ANEMIJO (28)	18
SLIKA 5: SHEMA OPTIČNE MERITVE HEMATOLOŠKEGA ANALIZATORJA	27
SLIKA 6: HEMATOLOŠKI ANALIZATOR ADVIA 120	28

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I: REFERENČNE VREDNOSTI HEMATOLOŠKIH TESTOV.....	11
PREGLEDNICA II: MORFOLOŠKO SPREMNENE OBLIKE ERITROCITOV ZNAČILNE ZA DOLOČENO BOLEZEN ...	12
PREGLEDNICA III: FAKTORJI KOREKCIJE GLEDE NA HT.....	31
PREGLEDNICA IV: PRIKAZ POVPREČNIH VREDNOSTI IN STANDARDNIH DEVIACIJ (SD) PARAMETROV ZA POSAMEZNE SKUPINE	34
PREGLEDNICA V: MINIMALNE IN MAKSIMALNE VREDNOSTI MCV GLEDE NA POSAMEZNO SKUPINO	36
PREGLEDNICA VI: NORMALNOST PORAZDELITVE SPREMENLJIVK RPI, Hb IN MCV	40
PREGLEDNICA VII: REZULTATI KRUSKAL-WALLIS- OVEGA TESTA.....	42
PREGLEDNICA VIII: REZULTATI MAN-WHITNEYEVEGA TESTA	43
PREGLEDNICA IX: REZULTATI HOLM-BONFERRONIJEVEGA TESTA GLEDE NA RPI	43
PREGLEDNICA X: REZULTATI HOLM-BONFERRONIJEVEGA TESTA GLEDE NA Hb	44
PREGLEDNICA XI: REZULTATI HOLM-BONFERRONIJEVEGA TESTA GLEDE NA MCV.....	44
PREGLEDNICA XII: KORELACIJA MED RPI IN RETIKULOCITI ZA POSAMEZNE SKUPINE.....	47

KAZALO GRAFOV

GRAF 1: ŠTEVILO PREISKOVANCEV GLEDE NA POSAMEZNO SKUPINO	33
GRAF 2: POVPREČNE VREDNOSTI Ht ZA POSAMEZNE SKUPINE	34
GRAF 3: POVPREČNE VREDNOSTI Hb ZA POSAMEZNE SKUPINE	35
GRAF 4: POVPREČNE VREDNOSTI MCV GLEDE NA POSAMEZNE SKUPINE	36
GRAF 5: POVPREČNE VREDNOSTI RPI GLEDE NA POSAMEZNO SKUPINO	37
GRAF 6: POVPREČNE VREDNOSTI Hb V SKUPINI DIALIZNIH BOLNIKOV GLEDE NA RETIKULOCITNI DELEŽ	38
GRAF 7: POVPREČNA VREDNOST RPI GLEDE NA VRSTO ANEMIJE V SKUPINI HEMATOLOŠKIH BOLNIKOV	39
GRAF 8: HISTOGRAM NORMALNOSTI PORAZDELITVE RPI	40
GRAF 9: HISTOGRAM NORMALNOSTI PORAZDELITVE Hb	41
GRAF 10: HISTOGRAM NORMALNOSTI PORAZDELITVE MCV	41
GRAF 11: KORELACIJA MED RPI IN ABSOLUTNIM ŠTEVILOM RETIKULOCITOV V SKUPINI DIALIZNIH BOLNIKOV	45
GRAF 12: KORELACIJA MED RPI IN ABSOLUTNIM ŠTEVILOM RETIKULOCITOV V SKUPINI HEMATOLOŠKIH BOLNIKOV	46
GRAF 13: KORELACIJA MED RPI IN ABSOLUTNIM ŠTEVILOM RETIKULOCITOV V KONTROLNI SKUPINI	46

POVZETEK

Število retikulocitov je parameter, ki odseva eritropoezno aktivnost kostnega mozga. Uporaben je pri določanju vzroka in vrste anemije, ter pri spremljanju odgovora kostnega mozga na terapijo, vendar je pri hudo anemičnih bolnikih lahko zavajajoč. Zato pa sintezni retikulocitni indeks (RPI) korigira število retikulocitov glede na število eritrocitov in poleg korekcije hematokrita upošteva tudi podaljšan čas dozorevanja retikulocitov, kar nakazuje na to, da bi bil lahko bolj primeren pokazatelj aktivnosti kostnega mozga.

V diplomski nalogi smo ugotavljali, kako izračunan RPI pokaže aktivnost kostnega mozga. Pogledali smo, kakšen je ta parameter glede na potek in vrsto anemije, ter kakšna je korelacija med tem parametrom in številom retikulocitov. V analizo smo vključili 478 anemičnih bolnikov, ki so bili na zdravljenju v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana od oktobra do decembra 2009. Razdelili smo jih v 2 skupini, in sicer na dializne in hematološke bolnike. V skupino dializnih bolnikov smo vključili 350 preiskovancev, v skupino hematoloških bolnikov pa 128. Kontrolno skupino je sestavljalo 262 športnikov. Analizo so opravili v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana. Vsem preiskovancem so v serumu izmerili naslednje parametre: hemoglobin (Hb), hematokrit (Ht), povprečen volumen eritrocitov (MCV), številčno koncentracijo retikulocitov, delež retikulocitov in številčno koncentracijo eritrocitov. Iz teh podatkov smo nato izračunali povprečne RPI vrednosti za posamezne skupine.

S korelacijsko analizo po Spearmanu smo ugotovili, da med RPI in številom retikulocitov obstaja statistično značilna močna pozitivna povezanost v vseh treh skupinah. Večji kot je RPI, večja je aktivnost kostnega mozga. Na osnovi naših rezultatov lahko sklepamo, da je RPI dober pokazatelj aktivnosti kostnega mozga.

ABSTRACT

Reticulocyte count is parameter that reflects erythropoetic activity of the bone marrow and is useful in anemia diagnosis and in monitoring effectiveness of therapy, but it can be misleading in severe anemic patients. Reticulocyte production index (RPI) corrects the reticulocyte count for both hematocrit and prolonged maturation time of reticulocytes in the peripheral blood, that is why it is more adequate indicator of bone marrow activity.

In our research we were assessing how calculated RPI shows the bone marrow activity, what is this parameter like regarding to type of anemia, and what is the correlation between RPI and reticulocyte count. We included in our research 478 anemic patients that were admitted to Univerzitetni klinični center Ljubljana from october to december 2009. We divided them into 2 groups, patients on dialysis and hematological patients. There were 350 patients in the group of dialysis and 128 in hematological group. In the control group there were 262 athletes. The studies were performed in Univerzitetni klinični center Ljubljana. All the patients were taken measurements of these parameters: hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht), mean corpuscular volume of erythrocytes (MCV), reticulocyte count, % reticulocyte and erythrocyte count. We used these data to calculate RPI for every group.

We concluded with Spearman's correlational analysis that there is statistically strong positive significance between RPI and reticulocyte count in all 3 groups. The higher the RPI is, the higher is bone marrow activity. On basis of our results we can conclude, that RPI is a good indicator of bone marrow activity.

SEZNAM OKRAJŠAV

DNK – deoksiribonukleinska kislina

ERC – eritrociti

Hb – hemoglobin

Ht – hematokrit

i.m. – intramuskularno

MCH – povprečna količina hemoglobina v eritrocitih

MCHC – povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih

MCV – povprečni volumen eritrocitov

RDW – koeficient variacije volumna eritrocitov

RET – retikulociti

RNK – ribonukleinska kislina

RPI – sintezni retikulocitni indeks

STR – serumski transferinski receptorji

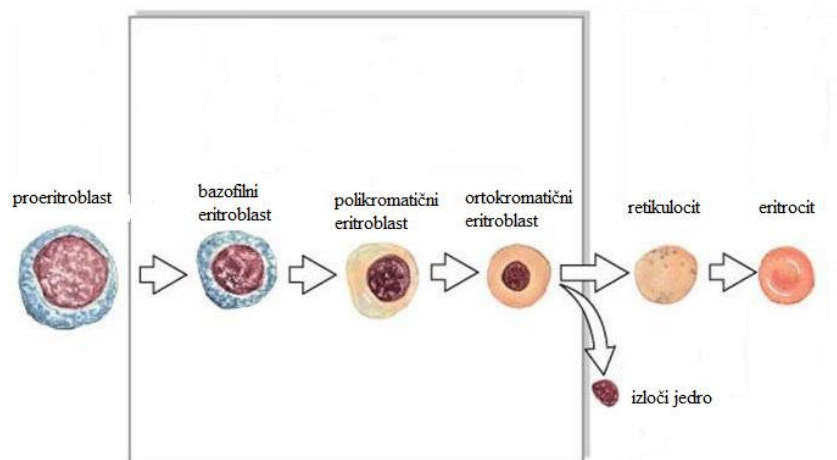
TIBC – totalna vezavna kapaciteta železa

1 UVOD

1.1 ERITROPOEZA

Eritropoeza je proces, pri katerem nastajajo eritrociti. Njihovo nastajanje stimulira hormon eritropoetin, ki se izloča iz ledvic, kadar v krvi pade parcialni tlak kisika. Pri nastajanju eritrocitov gre za dva procesa, ki potekata hkrati: delitev (proliferacija) in dozorevanje (diferenciacija).

Razvoj se začne v kostnem mozgu s pluripotentno matično celico, ki se razvije v multipotentno matično celico mieloične vrste, ta pa dozoreva v matične celice, ki so usmerjene v določeno vrsto krvnih celic. Iz matičnih celic usmerjenih v rdečo vrsto nastajajo predhodniki eritrocitov – eritroblasti. Med dozorevanjem eritroblastov opazimo manjšanje celice, izgubo jedrca, spremembo razmerja jedro/citoplazma, zgoščevanje kromatina v grude ter dozorevanje citoplazme, ki zaradi sinteze hemoglobina (Hb) postaja vse bolj acidofilna. Ko eritroblasti izločijo jedro, nastanejo nezreli eritrociti, ki jih imenujemo retikulociti (slika 1). Ti so nekoliko večji kot eritrociti in še vedno vsebujejo ostanke RNA. Retikulociti še nekaj časa ostanejo v kostnem mozgu, nato pa se izplavljajo v kri, kjer v približno 24 urah izgubijo RNA in dozoriijo v eritrocite (1). Zrel eritrocit preživi v obtoku približno 120 dni. Makrofagi vranice, jeter in kostnega mozga iz obtoka vsakodnevno odstranijo približno 0,8% vseh eritrocitov. Ti se sproti nadomeščajo z novimi eritrociti, razen če pride do motenj eritropoeze, te pa se kažejo kot anemija (2).



Slika 1: Dozorevanje celic rdeče vrste

1.2 ANEMIJE

Po temeljni opredelitvi pomeni anemija zmanjšano kapaciteto volumske enote krvi za prenos kisika, kar je lahko posledica zmanjšane koncentracije funkcionalnega hemoglobina (Hb) ali zmanjšane koncentracije normalnih eritrocitov v krvi. Anemija sama po sebi ni bolezen, temveč bolezenski znak, ki kaže na prisotnost neke motnje, ki je povzročila anemijo (3).

Zaradi nezadostne oskrbe tkiv s kisikom, se pojavijo različni nespecifični simptomi: splošna slabost, utrujenost, omotičnost, vrtoglavica, bledica, glavobol, slaba koncentracija. Simptomi akutne anemije s približno enako koncentracijo Hb v krvi so izrazitejši kot simptomi kronične anemije, pri kateri so se že razvili kompenzacijski mehanizmi. Tako lahko bolniki s kroničnimi anemijami ostanejo asimptomatski. Kompenzacijski mehanizmi, ki jih aktivira hipoksija, povzročijo tahikardijo, poveča se minutni volumen srca, srčna mišica hipertrofira, pokažejo se znaki razvoja ateroskleroze (angina pectoris). Ob hudih anemijah bolniki čutijo palpitacije že ob mirovanju, sicer pa že ob blagem naporu. Takšno stanje lahko vodi v srčno popuščanje zaradi pretirane obremenitve srčne mišice. Sicer pa so simptomi odvisni tudi od vzrokov za razvoj anemije, saj je le-ta predvsem posledica drugih bolezni (3,4,5,6).

Vzroki za nastanek anemij so različni:

- pomanjkljivo nastajanje eritrocitov ali Hb (bolezni kostnega mozga, kemoterapija, pomanjkanje železa, vitamina B12, folne kisline)
- krvavitve
- pospešeno propadanje eritrocitov (hemoliza)

Normalna koncentracija Hb za moške je 140–180 g/L, za ženske pa 120–160 g/L. Glede na koncentracijo Hb lahko ocenimo stopnjo anemije:

- blaga anemija (>100 g Hb/L)
- srednje huda anemija (70-100 g Hb/L)
- huda anemija (< 70 g Hb/L) (1)

Po koncentraciji Hb v eritrocitu ločimo hipokromne (koncentracija Hb v eritrocitu je manjša od normalne) in normokromne anemije (koncentracija Hb v eritrocitu je normalna). Glede na povprečni volumen eritrocitov (MCV) pa razdelimo anemije v makrocitne, normocitne in mikrocitne. O anozocitozi govorimo, kadar so velikosti eritrocitov zelo različne (4).

1.2.1 MIKROCITNE ANEMIJE

O mikrocitni anemiji govorimo, kadar je povprečni volumen eritrocitov v krvi manjši od 81 fL, znižana je tudi povprečna količina Hb, medtem ko se povprečna koncentracija Hb v eritrocitih zniža le pri hudih anemijah (5). Če je sinteza Hb motena, se celice eritroblastov večkrat delijo (4), z vsako delitvijo pa se velikost eritroblasta zmanjša. Tako nastanejo eritrociti, ki so manjši kot normalno in vsebujejo manj Hb – hipokromi eritrociti. Vzroki za nastanek mikrocitne anemije so lahko:

- pomanjkanje železa (sideropenična anemija)
- motnje v izkoriščanju železa (sideroplastna anemija)
- nezadostna sinteza polipeptidnih verig (talasemije) (5)

SIDEROPENIČNA ANEMIJA

Sideropenična anemija oz. anemija zaradi pomanjkanja železa je med vsemi najpogostejša. Pojavlja se pri ljudeh vseh starosti in različnega socialnega položaja, pogostejša pa je pri mladini in ženskah v rodni dobi (1). Železo je esencialni element, ki sodeluje v sintezi Hb. Če se zaradi neuravnane presnove izprazniijo zaloge železa v telesu, se zmanjša sinteza Hb in se postopoma razvije mikrocitna hipokromna anemija.

Z normalno prehrano običajno zaužijemo dovolj železa, zato neustrezna prehrana ni glavni vzrok sideropeničnih anemij (4). Najpogosteje se anemija pojavi zaradi povečane izgube železa zaradi kroničnih krvavitev; močnih menstruacij pri ženskah v rodni dobi, ginekoloških krvavitev zaradi bolezni (tumor), krvavitev v prebavnem traktu, ki so lahko posledica ulkusa, polipov, hemeroidov, hiatalnih hernij, vnetij ali nekaterih zdravil (salicilati, glukokortikoidi) (1). Slaba absorpcija železa iz hrane je lahko vzrok nastanka anemije predvsem pri bolnikih z atrofičnim gastritisom ali celiakijo (5). V nosečnosti in v obdobju rasti pa se anemija lahko razvije zaradi povečanih potreb po železu (4).

SIDEROBLASTNA ANEMIJA

Sideroblastne anemije so skupina anemij, pri katerih se v kostnem mozgu pojavijo prstanasti sideroblasti, značilno pa je tudi kopičenje železa v telesu. Zaradi motenj v sintezi hema se železo nabira v mitohondrijih normoblastov, predvsem okoli jedra, sicer pa so celice kostnega mozga normalne. Zaradi neučinkovite eritropoeze je železa v telesu preveč, lahko se razvije hemokromatoza, zlasti če pacient dobiva transfuzije krvi. Anemija je normokromna in normocitna ali, v hujših primerih, hipokromna mikrocitna. Bolezen je lahko podedovana ali pridobljena. Pri podedovani sideroblastni anemiji je motena sinteza porfirina zaradi pomanjkanja encima sintetaze γ -aminolevulinske kisline ali pa primanjkuje piridoksalfosfata, koencima pri sintezi γ -aminolevulinske kisline (4). Tako je motena sinteza hema, ki sestavlja hemoglobin.

Sideroblastna anemija lahko spremlja malignome, npr. melanome in karcinomske metastaze in je lahko posledica pomanjkanja vitamina B₆ zaradi prehitre porabe v neoplastičnih celicah. Pojavi se tudi pri zastrupitvah s svincem in pri alkoholikih. Svinec inaktivira sulfhidrilne skupine encima, ki sodeluje v sintezi hema in povzroča hemolizo, ker neposredno okvarja membrano eritrocita. Pri alkoholikih pa je zavrtja sprememba piridoksina v piridoksalfosfat zaradi oksidacije etanola, zato pride do motenj v sintezi hema (4).

TALASEMIJE

Pri talasemijah gre za podedovano nezadostno tvorbo sicer normalnih verig globina. Zaradi neuskklajene tvorbe verig, je ena od verig v presežku. Posledica je obarjanje v eritrocitu v obliki vključenih Heinzovih teles, ki poškodujejo membrano eritrocitov, kar vodi v hemolizo. Celice pogosto odmrejo že v kostnem mozgu. Poznamo več vrst talasemij. Pri talasemiji α je zmanjšano nastajanje α verig globina, pri β talasemijah pa β verig. Talasemija α je razširjena predvsem v južni Aziji, talasemija β pa v Sredozemlju (4,1).

1.2.2 MAKROCITNE ANEMIJE

Pri makrocitnih anemijah je povprečni volumen eritrocita večji od 94 fL. Delitve eritroblastov so manj številne in trajajo dlje. Dozorevanje jedra zaostaja za citoplazmo. Pri tem sinteza Hb ni okrnjena (5).

MEGALOBLASTNE ANEMIJE

Megaloblastna anemija je vedno makrocitna. Glavna značilnost so spremenjeni eritroblasti v kostnem mozgu, po katerih je dobila ime – megaloblasti. Ti nastanejo zaradi motnje v sintezi DNA. Prizadete so predvsem celice, ki se hitreje in bolj obnavljajo. Sem sodijo nezrele krvne celice v kostnem mozgu. Med temi je najbolj prizadeta rdeča celična vrsta (eritroblasti). Generacijski čas teh celic je povečan, zato imajo te celice večji volumen citoplazme kot sicer, razvoj jedra pa je moten (1). Največkrat takšne motnje nastanejo pri pomanjkanju vitamina B12, folatov ali obeh. Redkeje je razlog zdravljenje z nekaterimi citostatiki – antagonisti folne kisline (metotreksat, ametopterin).

Glavna naloga folne kisline je sinteza purinov in timina, ki sta nujno potrebna za sintezo DNA. Naš organizem folne kisline ne more sintetizirati, zato jo moramo vnesti s hrano (400 µg/dan). Prisotna je predvsem v rastlinski hrani, vendar se med kuhanjem uniči, kar je glavni razlog za pomanjkanje folatov. Poleg tega pride do pomanjkanja folatov zaradi povečanih potreb (nosečnice, otroci, bolniki s kronično hemodializo in malignimi tvorbami) ali zmanjšane absorpcije folatov (celiakija, nekatera zdravila) (5). Najpogostejši bolniki so kronični alkoholiki, predvsem zaradi pomanjkljive prehrane, poleg tega pa alkohol ovira absorpcijo folatov in suprimira kostni mozeg (7).

Vitamin B12 ravno tako sodeluje pri sintezi DNA, zato njegovo pomanjkanje povzroči podobno motnjo kot pomanjkanje folne kisline (3). Neizpolnjenost količine vitamina B12 v hrani so le malokdaj vzrok megaloblastne anemije, ker zaloge v telesu zadostujejo za več let. Do pomanjkanja vitamina B12 najpogosteje pride zaradi zmanjšane absorpcije, ki je lahko posledica bolezn tankega črevesa ali pomanjkanja intrinzičnega faktorja, ki je nujen za absorpcijo vitamina. Megaloblastno anemijo zaradi pomanjkanja intrinzičnega faktorja imenujemo perniciozna anemija. Gre za avtoimunsko motnjo, pri kateri se tvorijo protitelesa proti intrinzičnemu faktorju oz. parietalnim celicam, ki ga proizvajajo. Poleg motenj v hematopoezi in obnovi epitelijev so pomembne še nevrološke motnje zaradi pomanjkanja vitamina B12, ki prek demielizacije vodijo v propad nevronov.

1.2.3 NORMOCITNE ANEMIJE

Pri normocitnih anemijah je MCV normalen (81-94fL), prav tako vsebnost Hb. Glede na število retikulocitov jih delimo na:

anemije z zmanjšanim številom retikulocitov:

- anemija pri kroničnih boleznih
- aplastična anemija

anemije s povečanim številom retikulocitov:

- anemije ob akutni krvavitvi
- hemolitične anemije (5)

APLASTIČNA ANEMIJA

Aplastična anemija je posledica okvare pluripotentne matične celice ali porušenega mikrookolja v kostnem mozgu, ki onemogoči normalno obnavljanje in dozorevanje matične celice (1). Okvaro povzroči poškodba rdečega kostnega mozga, ki lahko nastane zaradi inaktivacije funkcionalnih beljakovin in poškodb DNA (poškodbe z ionizirajočimi žarki) ali zaradi zmanjšane oz. zavrte sinteze RNA in DNA v celicah kostnega mozga (zastrupitev z benzenom, uporaba citostatikov). Takšna anemija pa je lahko tudi posledica razmeroma redkih dednih motenj (Fanconijeva anemija). Hemopoeza v kostnem mozgu je popolnoma ali zelo zavrta. Moteno je nastajanje vseh krvnih celic (pancitopenija), zato so v krvni sliki levkopenija, trombocitopenija in anemija, kar vodi v večjo možnost krvavitev in infekcij. Značilno je tudi zmanjšanje števila ali popolna odsotnost nezrelih eritrocitov – retikulocitov v krvi (4,5).

Čista aplastična anemija

Čista aplastična anemija je posledica motene delitve in dozorevanja v rdečo vrsto usmerjenih matičnih celic, medtem ko granulociti in trombociti nastajajo normalno. Nastane lahko pri popolnoma zdravih ljudeh, predvsem kot posledica okužb (atipična pljučnica, infekcijska mononukleoza, mumps, virusni hepatitis), po jemanju nekaterih zdravil (salicilati, kolhicin, kloramfenikol, sulfonamidi, cefalosporini), kot zaplet nekaterih hemolitičnih anemij, predvsem podedovane sferocitoze, pri tumorju priželjca, avtoimunskih motnjah. Vzroki niso v celoti pojasnjeni, verjetno pa nastajajo protitelesa, ki zavirajo eritropoezo, ker so usmerjena proti antigenu na eritroblastu. V krvni sliki ne

opazimo pancitopenije, razvije se le normocitna anemija z zmanjšanim številom oz. odsotnostjo retikulocitov. Eritrociti so normokromi. Pregled kostnega mozga pokaže pomanjkanje proeritroblastov in naslednjih stopenj v razvoju eritrocita (4,1).

ANEMIJE PRI KRONIČNIH BOLEZNIH

Anemija pri kronični bolezni je skupen klinični sindrom, za katerega je značilna znižana koncentracija železa in skupna vezalna kapaciteta za železo v serumu, dovolj pa je zaloga železa v kostnem mozgu. Razlogov za anemijo je več. Pomembna je vloga citokinov, ki lahko direktno vplivajo na eritrocitne prekursorje, motijo metabolizem železa ali delujejo preko eritropoetina. Pri anemiji zaradi kronične bolezni ni primerne odgovora eritropoetina na anemijo (7).

Anemije pri kroničnih vnetjih

Pri vnetju se iz monocitov in makrofagov sprošča interlevkin 1, ki zavre eritropoezo in pospeši nastajanje apoferitina v makrofagih. V serumu se zniža koncentracija transferina in železa, zviša pa se koncentracija laktoferina, ki železo prenaša v makrofage. Tako je v makrofagih železa preveč, medtem ko ga eritroblasti v kostnem mozgu nimajo na razpolago dovolj za sintezo Hb, čeprav so zaloge železa normalne ali celo povečane. Življenjska doba novonastalih eritrocitov se še dodatno zmanjša, kar je posledica povečane fagocitne aktivnosti makrofagov. Odgovor kostnega mozga na anemijo je neustrezen zaradi motnje v presnovi železa, zmanjšane sproščanja eritropoetina in tvorbe inhibitorjev eritropoeze (interferon β , γ) (4,1).

Anemija pri kronični ledvični odpovedi

Ta vrsta anemije je predvsem posledica odpovedi endokrine funkcije ledvic. Zaradi zmanjšane tvorbe eritropoetina, se zmanjša sinteza in dozorevanje eritrocitov. Uremični toksini (urea, kreatinin) še dodatno zmanjšajo eritropoezo. Kronična odpoved ledvic poveča nagnjenost h krvavitvam v prebavila in sečila, kar dodatno prispeva k nastanku anemije. S hemodializo se izgublja kri, izločajo pa se tudi folati (5,1).

Anemija pri kroničnih jetrnih boleznih

Pri jetrnih boleznih je skrajšana življenjska doba eritrocitov zaradi povečanja koncentracije lipidov v membrani (nastanejo tanki makrociti). Prisotne so tudi krvavitve in pomanjkanje nekaterih vitaminov (B6, B12, folati) (7).

Anemija pri endokrinih boleznih

Anemije se lahko razvijejo tudi pri hormonskih motnjah, npr. pri hipotireozii imamo manj tiroksina in s tem manjše potrebe po kisiku, zaradi česar se zmanjša aktivnost kostnega mozga (4). Tudi pri pomanjkanju ravnega hormona, glukokortikoidov ali testosterona se lahko razvije blaga anemija, ki po zdravljenju z nadomestnimi hormoni praviloma izzveni (1).

Mielofizična anemija

Mielofizična anemija je posledica obsežne infiltracije rdečega kostnega mozga z rakastimi celicami ali celicami druge vrste (vnetne celice, vezivo), kar spremeni zgradbo kostnega mozga, moti razvoj krvnih celic in njihovo izplavljanje v kri (1).

HEMOLITIČNE ANEMIJE

Hemolitična anemija nastane, ko povečana razgradnja eritrocitov prehiteva sprotno pospešeno nastajanje. Nesorazmerje med razgrajevanjem in nastajanjem eritrocitov se odraža v stopnji nastale anemije, v povečani eritropoezi in z zvečanjem števila retikulocitnih celic v periferni krvi. Vzrok povečanega razpadanja so spremembe v zgradbi eritrocita (korpuskolarne anemije) ali spremembe izven eritrocita, ki okvarijo krvne celice (ekstrakorpuskolarne anemije) (7). Korpuskolarne motnje so večinoma podedovane:

- motnje v membrani ali citoskeletu eritrocita
 - dedna sferocitoza, eliptocitoza, dedna piropoikilocitoza, kserocitoza, hidrocitoza
- pomanjkanje nekaterih encimov v eritrocitu
 - piruvat kinaze, glukoza-6-fosfatne dehidrogenaze
- motnje v molekuli Hb
 - hemoglobinopatije

Večina motenj zunaj eritrocita, ki povzročajo hemolizo, je pridobljenih. Pojavijo se kot samostojna bolezen ali posledica drugih bolezni.

Avtoimunske hemolitične anemije

so skupina hemolitičnih anemij pri katerih so prisotna protitelesa za antigene lastnih eritrocitov (avtoprotitelesa).

Imunske ali avtoimunske hemolitične anemije zaradi zdravil

Nekatera zdravila lahko povzročijo imunsko hemolizo sicer normalnih eritrocitov. Način nastanka te vrste anemij ni enoten. Lahko nastanejo protitelesa za zdravilo, ki je kot haptent vezano na neko beljakovino na eritrocitni membrani in povzročijo hemolizo. Protitelesa povzročijo hemolizo le v prisotnosti zdravila (haptena). V drugem primeru se zdravilo veže na beljakovino v plazmi (sestavljeno antigen). Nastanejo protitelesa za sestavljen antigen. Imunski kompleks (protitelo-antigen) se nespecifično veže na površino eritrocitov in aktivira sestavine komplementa, ki povzroči hemolizo. Lahko pa se pod vplivom zdravila pojavijo protitelesa za antigene lastnih eritrocitov (1).

Mehanske hemolitične anemije

Do mehanske okvare eritrocitne membrane lahko pride pri:

- srčnih napakah (aortne zaklopke, umetne zaklopke)
- stanjih s spremembami v arteriolah in prekapilarah (zaradi odlaganja fibrinskih vlaken na površino žilic, kar mehansko poškoduje eritrocite)
- zdravih osebah po daljši hoji ali teku (okvara eritrocitov v žilicah na podplatu)

Drugi vzroki za hemolitične anemije:

- zastrupitve z arzenom, svincem, bakrovimi solmi, klorati
- po pikih nekaterih žuželk in kač
- po obsežnih opeklinah
- pri nekaterih okužbah (1)

ANEMIJA OB AKUTNI KRVAVITVI

Anemija se kmalu po razmeroma veliki akutni anemiji pojavi zaradi razredčenja krvi ob prestopu intersticijske tekočine v kapilare. Tako nastane normokroma normocitna anemija. Ta se še poveča, ko se zaradi zadrževanja soli in vode v telesu volumen krvi normalizira, saj se hitreje nadomesti volumen plazme kot celični elementi. Če izguba krvi ni bila velika, se bo anemija sčasoma popravila brez sprememb v obliki ali obarvanosti eritrocitov, poveča se le število retikulocitov zaradi hitrejšega izplavljanja celic iz kostnega mozga (3).

1.3 DIAGNOSTIKA ANEMIJ

Vzrok za anemijo lahko najdemo že s fizičnim pregledom, opazovanjem kliničnih znakov in anamnezo. Anamneza lahko pokaže vzroke za anemije zaradi dednih nepravilnosti (hemolitična anemija, sferocitoza, talasemija). Nenaden pojav pancitopenije pri drugače zdravih posameznikih lahko pojasnimo s pacientovo zgodovino, izpostavitvijo toksičnim kemikalijam. Rasa je prav tako lahko pomemben znak, saj so številne hemoglobinopatije in dedna pomanjkanja encimov značilna za določeno raso (7,11).

Pacienta moramo podrobno izprašati o začetku pojava simptomov, prehrabnih navadah, pitju alkohola, o morebitni transfuziji, pregledamo stare izvide krvnih slik, smo pozorni na simptome akutnih ali kroničnih bolezni, kot so izguba teže, vročina, nočno znojenje. Nekateri znaki so značilni za določeno anemijo (11). Npr. pacienti s pomanjkanjem železa imajo lomljive krhke nohte in lase, razgrade v ustnih kotih, pri makrocitni anemiji zaradi pomanjkanja vitamina B12 ali folata pride do svetlo rumenega obarvanja kože in sluznic, pacienti težko požirajo, pri hemolitični anemiji pa se lahko razvije zlatenica (2).

Čeprav fizični pregled in anamneza lahko kažeta prisotnost anemije, je laboratorijska določitev nujna za natančno diagnozo in zdravljenje anemije. Hematološki laboratoriji ponujajo več testov, ki so pomembni pri diagnozi anemije:

- krvna slika
- oskrba z železom
- pregled kostnega mozga
- določanje vitaminov B12, folata
- bilirubin
- haptoglobin
- hemosiderin
- Hb v urinu/serumu
- Coombsov test

1.3.1 KRVNA SLIKA

Kompletna krvna slika vključuje številčno koncentracijo eritrocitov, koncentracijo Hb, Ht, povprečen volumen eritrocitov (MCV), povprečna količina Hb v eritrocitih (MCH), povprečna koncentracija Hb v eritrocitih (MCHC), številčno koncentracijo trombocitov, levkocitov, število retikulocitov, morfološke lastnosti eritrocitov.

Preglednica I: *Referenčne vrednosti hematoloških testov*

eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	4,5-6,3 moški 4,2-5,4 ženske
Hb (g/L)	140-180 moški 120-160 ženske
Ht	0,40-0,54 moški 0,37-0,47 ženske
MCV (fL)	81-94
MCH (pg)	26-32
MCHC (g/L)	310-350
retikulociti ($\times 10^9/L$)	21-94
levkociti ($\times 10^9/L$)	4-10
trombociti ($\times 10^9/L$)	140-340

Koncentracija Hb predstavlja prvi parameter za oceno prisotnosti anemije. Za diagnozo anemije moramo dobljene vrednosti Hb primerjati z referenčnimi vrednostmi, ki so odvisne od starosti in spola. Če koncentracija Hb v krvi pri ženskah pade pod 120 g/L oz. pri moških pod 130 g/L, je to resen znak za prisotnost anemije (preglednica 1). Normalne vrednosti Hb in Ht so odvisne tudi od fizioloških in okoljskih dejavnikov. Ljudje, ki živijo na višji nadmorski višini in kadilci imajo normalno višje vrednosti Hb in Ht, kar moramo upoštevati pri diagnozi. Pri določanju koncentracije Hb v krvi moramo upoštevati stanja, kjer koncentracija ne odseva dejanskih sprememb celotne količine Hb oz. eritrocitov. Tako stanje najdemo na primer pri anemiji po akutni krvavitvi ali pri spremembah volumna plazme, ki niso povezane s spremembo količine eritrocitov (dehidracija, hiperhidracija) (2,11,13).

S povprečnim volumnom eritrocitov detektiramo spremembe v volumnu eritrocitov. Mikroцитni, hipokromni eritrociti navadno pomenijo anemijo zaradi pomanjkanja železa, makrocite pa vidimo pri megaloblastnih anemijah. Pri določanju MCV se lahko pojavijo napake zaradi aglutinacije, distorzij v obliki eritrocitov, prisotnosti velikega števila levkocitov ali zaradi nenadne osmotske nabreklosti (11). Pacienti z vrednostmi MCH manjšimi od 26 pg (hipokromni) so nezmožni sintetizirati normalne količine Hb, zato lahko sumimo na anemijo zaradi pomanjkanja železa ali talasemije. Visoka retikulocitoza nas

opozarja na možnost krvavitve ali hemolize, retikulopenija pa je indikator okrnjene proizvodnje eritrocitov (2).

Čeprav avtomatizirani instrumenti zagotavljajo točne rezultate, nam morfolologija celic, ki jo vidimo pod mikroskopom, lahko da pomembne dodatne informacije o vrsti anemije (preglednica II). Na ta način lahko zaznavamo variacije v velikosti (anizocitoza), variacije v obliki eritrocitov (poikilocitoza) in različne oblike celic (sferociti,...) (11).

Preglednica II: *Morfološko spremenjene oblike eritrocitov značilne za določeno bolezen*

različne oblike eritrocitov	opis	bolezen
ehinociti	enakomerni drobni izrastki	bolezni ledvic
akantociti	številni neenakomerni izrastki	bolezni jeter
shizociti	celice z odtrganim delom	mikroangiopatična hemolitična an. (DIC, TTP)
dakriociti	celice v obliki solze	talasemije mielofibroza
sferociti	sferične celice, niso vbočene	hereditarna sferocitoza hemolitična anemija
kodocit	tarčaste celice	ledvične bolezni talasemija pomanjkanje železa
eliptociti	ovalne celice	hereditarna eliptocitoza
drepanociti	srpasti eritrociti	anemija srpastih celic
Heinzova telesca	denaturiran Hb	talasemije nestabilni Hb prirojene hemolitične an.
Pappenheimerjeva telesca	groba bazofilna zrnca, ki vsebujejo železo	megaloblastne anemije sideroblastne anemije mielodisplastični sindrom
Howell-Jollyjeva telesca	ostanki jedra	splenektomija
Cabotovi obročki	ostanki delitvenega vretena	splenektomija megaloblastna anemija

Sedimentacija eritrocitov je enostavna preiskava, ki sicer ne sodi v krvno sliko, jo pa skoraj vedno opravimo skupaj z njo. Pri anemijah je sedimentacija pospešena, saj je v krvi manj eritrocitov. Na hitrost sedimentacije pa vplivajo tudi spremembe v sestavi plazemskih beljakovin. Tako tudi vnetje pospeši sedimentacijo, in sicer zaradi zvečane koncentracije imunoglobulinov in fibrinogena (1).

1.3.2 TESTI ZA DOLOČANJE OSKRBE Z ŽELEZOM

Testi za določanje oskrbe z železom vključujejo koncentracijo železa v serumu, totalno kapaciteto za vezavo železa (TIBC), nasičenost transferina, količino feritina in določanje serumskih transferinskih receptorjev. Imajo pomembno vlogo v začetni diferencialni diagnostiki anemij (11,13).

- **Koncentracija železa v serumu**

Koncentracija železa v serumu kaže količino železa vezanega na transferin. Normalno so koncentracije železa pri moških 11-32 $\mu\text{mol/L}$, pri ženskah 8-30 $\mu\text{mol/L}$. Od koncentracije železa v serumu je odvisna zmožnost sinteze Hb in nastanek eritrocitov. Če koncentracija pade pod minimalno referenčno mejo, bodo novonastali eritrociti vsebovali manj Hb (hipohromni eritrociti).

- **TIBC (totalna vezavna kapaciteta železa)**

TIBC predstavlja maksimalno količino železa, ki se lahko veže na transferin. Ta parameter nam služi za indirektno oceno količine transferina v krvi. Referenčne vrednosti TIBC so 49-72 $\mu\text{mol/L}$. Pri pacientih s hudim pomanjkanjem železa TIBC tipično naraste nad 72 $\mu\text{mol/L}$ (13).

- **Nasičenost transferina**

Nasičenost transferina izračunamo iz koncentracije železa v serumu in TIBC. Normalo nasičenje transferina je med 20 in 50%. Če pade pod 10% gre za pomanjkanje železa. Pri nasičenju med 10 in 20% pa je lahko vzrok tudi kronično vnetje. Pri koncentracijah večjih od 50% sumimo na stanje dedne hemokromatoze (11).

- **Koncentracija feritina v serumu**

Koncentracija feritina v serumu nam pove, kakšne so zaloge železa v telesu. Kadar so zaloge železa izčrpane, koncentracija feritina pade. Pri sideropeniji je ta metoda najkoristnejša za ugotavljanje znižanih zalog železa, medtem ko sta koncentracija železa v

serumu in TIBC še v mejah normale. Količine pod 10-15 µg/L kažejo na izrabo zalog železa. Pri prekomernem nalaganju železa, koncentracija feritina naraste nad 300 µg/L, naraste pa lahko tudi pri boleznih ledvic in vnetjih (7,11).

- **Serumski transferinski receptorji (STR)**

STR so samostojen stabilen kazalec zalog železa, neodvisen od različnih fizioloških dejavnikov (nosečnost, otroštvo, adolescenca) in vnetja, medtem ko na večino običajnih laboratorijskih kazalcev (koncentracija serumskega železa, feritina, transferina, TIBC, MCV) ti dejavniki vplivajo. Zato so dragocen pripomoček za določanje pomanjkanja železa pri nosečnicah, nedonošenčkih, dojenčkih in bolnikih s kroničnimi sistemskimi boleznimi. STR določamo v serumu z imunološkimi preiskavami (ELISA, RIA). Pri ljudeh, ki so brez ali imajo minimalne zaloge železa, je koncentracija STR velika, pri tistih z obilnimi zalogami pa majhna (14). Z določanjem STR in feritina zelo dobro definiramo status železa v zalogah in ločimo med sideropenično anemijo in kronično anemijo (7).

1.3.3 PREGLED KOSTNEGA MOZGA

Punkcija oz. biopsija kostnega mozga sta pri diagnostiki večine anemij redko potrebni. Uporabimo ju takrat, ko obstaja sum na pridruženo krvno bolezen, kot so npr. mielodisplazija, limfoproliferativne bolezni in levkemije, če sumimo na infiltrate solidnih tumorjev (dojka, prostata, želodec, pljuča) v kostnem mozgu (9) ali pa z drugimi laboratorijskimi testi nismo uspeli ugotoviti vzroka anemije (6). S pregledom kostnega mozga lahko potrdimo diagnozo aplastične, megaloblastne in sideroblastne anemije.

1.3.4 LABORATORIJSKE PREISKAVE ZA DOKAZOVANJE MEGALOBLASTNE ANEMIJE

- **Določanje vitamina B12 in folata**

Pri sumu na megaloblastno anemijo preverimo serumsko koncentracijo vitamina B12, koncentracijo folata na tešče v serumu in tisto v eritrocitih (le-ta je manj podvržena vsakodnevnim nihanjem, medtem ko se serumska koncentracija hitro spreminja). Zaradi medsebojne povezanosti metabolizmov folata in vitamina B12 koncentraciji obeh vitaminov vedno ocenjujemo hkrati (2).

- **Določanje protiteles proti parietalnim celicam in intrinzičnem faktorju**

Določanje protiteles proti intrinzičnem faktorju je visoko specifičen test za dokaz perniciozne anemije, vendar negativen rezultat perniciozne anemije ne izključuje. Protitelesa proti parietalnim celicam so prisotna pri 90% bolnikov perniciozne anemije. Če je test s protitelesi pozitiven in obstaja klinična slika perniciozne anemije, lahko potrdimo diagnozo. Če pa so protitelesa negativna, je potrebno narediti Schillingov test (13).

- **Schillingov test**

Schillingov test je osnovni diagnostični test za perniciozno anemijo. Z merjenjem količine izločenega radioaktivnega vitamina B12 v urinu glede na vnešenega lahko ocenimo absorpcijo vitamina B12. Test ponovimo z dodatkom intrinzičnega faktorja. Če se količina izločenega radioaktivnega vitamina B12 normalizira, je vzrok pomanjkanja vitamina B12 pomanjkanje ali napaka intrinzičnega faktorja (13). Če se stanje ne normalizira, gre lahko za okužbo s paraziti oz. bakterijami ali zmanjšanje površine sluznice za absorpcijo (12).

- **Test s fiziološkim odmerkom folne kisline**

Test pokaže terapevtski odgovor, ki pri pomanjkanju vitamina B12 izostane. Služi za razlikovanje megaloblastne anemije zaradi pomanjkanja vitamina B12 in folne kisline (13).

- **Določanje formiminoglutaminske kisline (FIGLU) v urinu**

Pomanjkanje folne kisline onemogoča razgradjo histidina v glutaminsko kislino, zaradi česar se kopiči metabolit FIGLU v urinu (13).

1.3.5 LABORATORIJSKE PREISKAVE ZA DOKAZOVANJE HEMOLIZE

Visoke koncentracije nekonjugiranega bilirubina v serumu so lahko posledica povečane razgradnje eritrocitov. Pri hemolitični anemiji je običajno v serumu 17-50 μ g/L nekonjugiranega bilirubina. Pri hudi hemolizi se v serumu zmanjša koncentracija haptoglobina, ker ga po vezavi prostega Hb makrofagi odstranijo v nekaj minutah. Vzroki za nizke koncentracije haptoglobina pa so lahko tudi hepatocelularne bolezni (zmanjšana sinteza haptoglobina) ali megaloblastna anemija (zaradi krvavenja v tkiva) (13). Hemoglobinurija in hemoglobinemija sta znaka hude intravaskularne hemolize, hemosiderin v sedimentu urina pa je dokaj zanesljiv znak kronične intravaskularne hemolize. Neposredni dokaz hemolize je potrditev skrajšane življenjske dobe z radioaktivnim kromom označenimi eritrociti (7). S Coombsovim testom ugotavljamo protitelesa proti eritrocitnim antigenom, ki so vezana na površini eritrocitov oz. so prosta v

plazmi. Pomemben je za ugotavljanje hemolitične bolezni pri novorojenčkih ali morebitnih protiteles proti eritrocitom pri bolnikih, ki prejemajo transfuzijo (1).

1.3.6 DIFERENCIALNA DIAGNOSTIKA

Anemija zaradi pomanjkanja železa je mikrocitna hipokromna, v razmazu periferne krvi so poikilociti. Število retikulocitov je normalno ali manjše, število levkocitov in trombocitov pa je normalno. V kostnem mozgu ugotovimo hiperplazijo celic rdeče vrste. Številni polikromatični normoblasti imajo pičel in nacefran citoplazemski rob. Pri reakciji na železo s kalijevim ferocianidom ni zrnca feritina in hemosiderina niti v eritroblastih niti makrofagih. Koncentracija železa v serumu je zmanjšana, nasičenost transferina z železom pa je manjša od 15%. Zmanjšana je tudi koncentracija serumskega feritina (slika 2) (1).

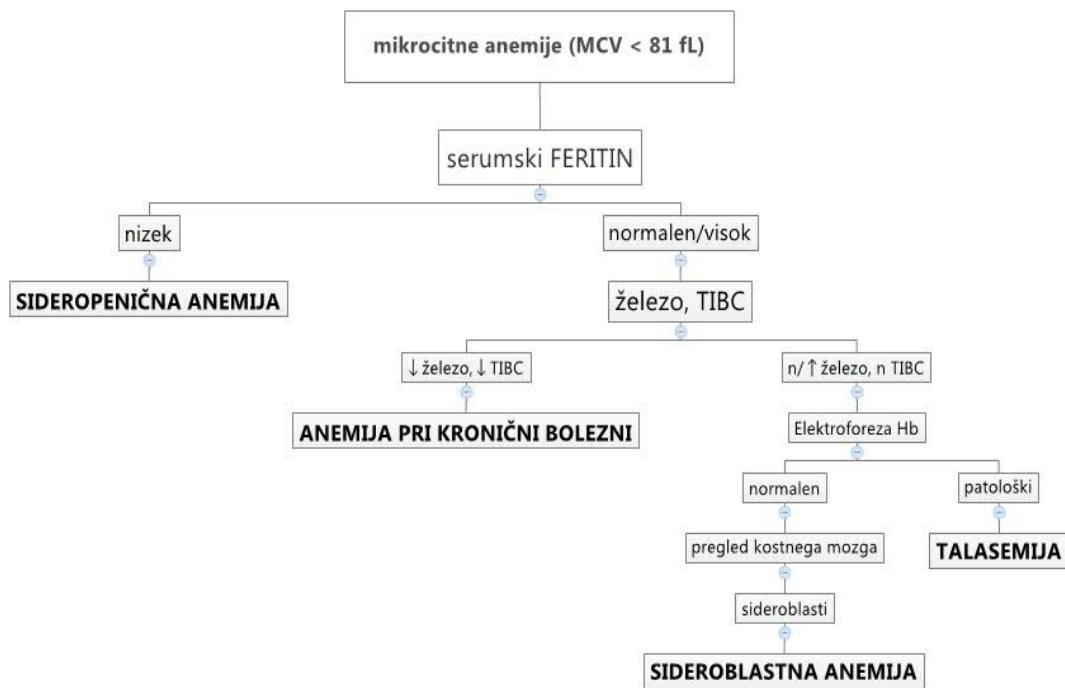
Pri anemijah kroničnih bolezni so običajno v ospredju znaki osnovne bolezni. V laboratorijskih izvidih najdemo normocitno normohromo anemijo s koncentracijo Hb okrog 100g/L. Število retikulocitov je normalno ali zmanjšano. Vrednosti železa, transferina in TIBC so zmanjšane, feritin je normalen ali zvišan. V kostnem mozgu najdemo kopičenje železa v makrofagih, medtem ko ga je v eritroblastih malo ali nič (slika 3) (7,1).

Skupno sideroplastnim anemijam je normalna ali zvišana koncentracija železa v krvi, v kostnem mozgu pa najdemo prstanaste sideroblaste (7).

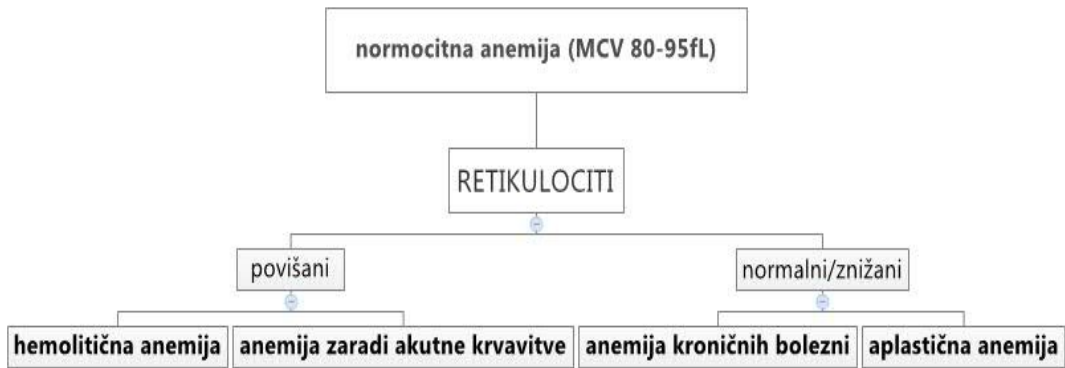
Anemija zaradi talasemije je hipokromna mikrocitna, koncentracija železa in TIBC pa je normalna. V perifernem razmazu vidimo tarčaste in bazofilno punktirane eritrocite, v elektroforezi Hb pa je zvišana vrednost HbA₂ (7).

Na aplastično anemijo posumimo, če pri bolniku ugotovimo pancitopenijo. Anemija je običajno normocitna in hude stopnje. Število retikulocitov je zmanjšano. V beli krvni sliki je izražena nevtropenija. Diagnozo potrdimo s citološkim in histološkim pregledom kostnega mozga. Kostni mozeg je pretežno hipocelularen, prevladuje maščoba. Celice mieloične vrste so redke. Serumska koncentracija železa je povečana, transferin je skoraj popolnoma nasičen z železom (slika 3) (1).

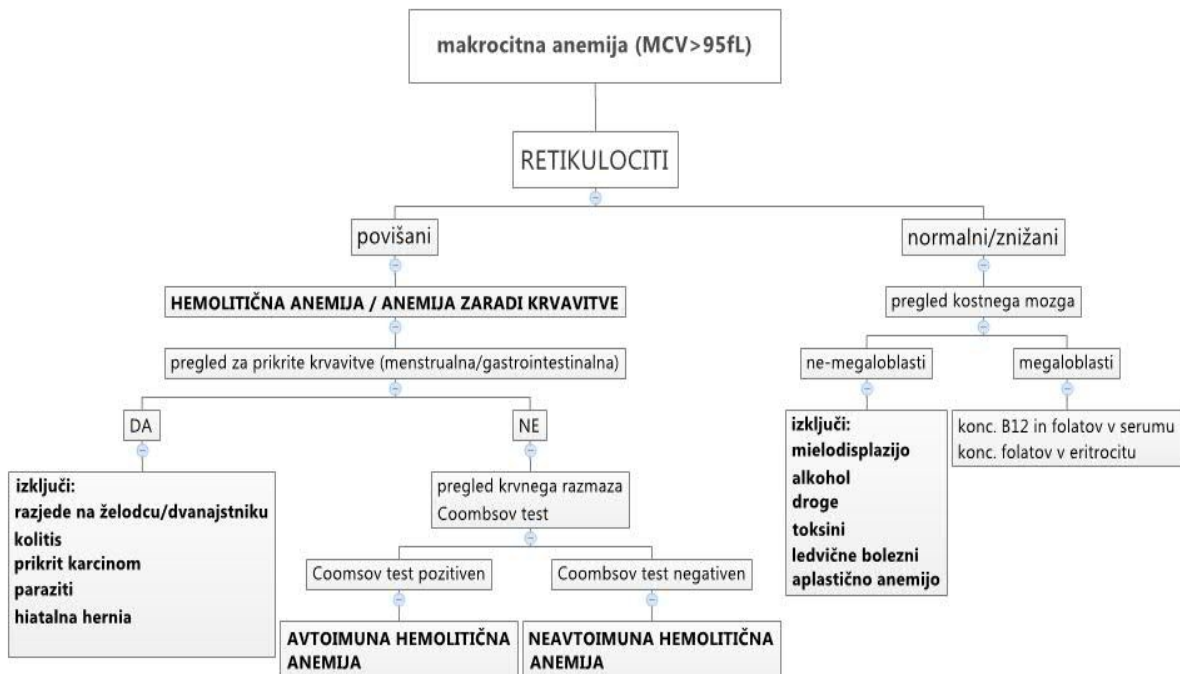
Poleg splošnih znakov anemije, pride pri hudih megaloplastnih anemijah (slika 4) tudi do zlatenice, ki je posledica povečane koncentracije bilirubina. Ta nastaja v večji meri zaradi povečane razgradnje eritroblastov v kostnem mozgu. Laboratorijski izvidi pokažejo zvišan MCV, znižan Hb, znižane vrednosti folne kisline v serumu. Število retikulocitov je normalno ali zmanjšano. V krvnem razmazu ugotovimo anizocitozo, poiklocitozo in polikromazijo. Značilni so veliki, ovalni, s Hb dobro polnjeni eritrociti. V eritrocitih so lahko vključki (bazofilne punktacije, Howell-Jollyjeva telesca, Cabotovi obročki). V periferni krvi najdemo hipersegmentirane nevtrofilce. Kostni mozeg je hiperplastičen, prevladujejo celice rdeče vrste (7,1).



Slika 2: Pristop k bolniku z mikrocitno anemijo



Slika 3: Pristop k bolniku z normocitno anemijo



Slika 4: Pristop k bolniku z makrocitno anemijo (28)

1.4 ZDRAVLJENJE ANEMIJ

Pri nefarmakološkem zdravljenju opozorimo bolnike na pomen ustrezne prehrane – raznovrstna in pravilno pripravljena hrana je bistvenega pomena pri preprečevanju in zdravljenju anemij. Ugotovitev vzroka anemije je nujna, saj nam omogoči vzročno zdravljenje. Zdravljenje je lahko simptomatično le pri idiopatskih anemijah, kjer vzroka še ne poznamo, v času opredeljevanja hude anemije ter pri genetskih anemijah, kjer vzročno zdravljenje še ni na razpolago (2).

Zdravljenje anemije zaradi pomanjkanja železa obsega obravnavo vzroka, ki je privedel do anemije in nadomestno zdravljenje z železom (2). Zdravila z železom dajemo peroralno, izjemoma parenteralno. Uporabimo zdravila dvovalentnega železa (ferosulfat, feroglukonat, ferolaktat), pa tudi trovalentnega železa, če je le-to vezano v poseben kompleks, da se lahko absorbira. Priporočen dnevni odmerek je 150–200 mg železa, razdeljen na 2-3 dele (1). Že prvi teden zdravljenja opazimo dvig retikulocitov. Anemijo popravimo v približno 6 tednih, z zdravljenjem pa nadaljujemo še 3-6 mesecev v odmerku 100mg/dan, da napolnimo zaloge železa (7,1). Če zaradi hudih stranskih učinkov peroralnega železa (slabost, zaprtje, prebavne motnje) to ni mogoče, ali pa kljub rednemu peroralnemu vnosu železa ni zelenega porasta koncentracije Hb (malabsorpcija), se odločimo za parenteralno nadomeščanje železa (9). Parenteralna zdravila dajemo globoko v mišico ali žilo. Zdravljenje začnemo z manjšo količino železa (50mg/dan) in nadaljujemo s 100 mg vsak dan ali vsak drugi dan. Pred začetkom zdravljenja ocenimo celoten odmerek železa. Pri intramuskularnem dajanju železa se lahko pojavita bolečina na mestu vboda in temnejša pigmentacija kože. Pri intravenskem dajanju lahko pride lokalno do flebotromboze, pa tudi do splošne reakcije: rdečica obraza, glavobol, vročina, slabost, bruhanje, bolečine v trebuhu, hipotenzija, krči, urtikarija, težko dihanje. Resnost anemije ali želja po hitri korekciji ne opravičita uporabe parenteralne terapije. Ne glede na pot vnosa železa eritrociti potrebujejo enako dolgo časa za privzem dodanega železa. Parenteralni vnos železa samo hitreje napolni zaloge železa, hematološki odgovor pa ni nič hitrejši (1,2).

Pri več kot 50% bolnikov sideroblastne anemije se stanje popravi, ko v terapijo uvedemo piridoksin. Piridoksin v odmerku 50 mg/dan popolnoma korigira anemijo, ki se lahko pojavi pri jemanju izoniazida pri zdravljenju tuberkuloze (13).

Pomanjkanje vitamina B12 zdravimo s parenteralnim nadomeščanjem le-tega v obliki hidroskobalamina ali cianokobalamina v kombinaciji s folno kislino per os (9). V prvem obdobju zdravljenja ozdravimo anemijo in napolnimo zaloge (štiri i.m. injekcije po 2,5 mg hidroskobalamina v presledku enega do dveh dni), temu pa sledi vzdrževano doživljenjsko zdravljenje, in sicer 2,5 mg i.m. vsake tri mesece (2). Odziv zaznamo po 3–5 dneh, ko poraste število retikulocitov, ki je največje okoli desetega dneva po začetem zdravljenju. Značilne megaloblastne spremembe v kostnem mozgu izginejo že 24–48 ur po začetem zdravljenju (6,9). Koncentracija Hb doseže normalne vrednosti v petih do šestih tednih. Učinek na spremembe v osrednjem živčevju je slabši; delno izboljšanje je moč pričakovati v prvih šestih mesecih. Kadar ne pride do retikulocitne krize ali je le-ta slabo izražena in ni pričakovanega kasnejšega porasta Hb, sklepamo da zdravljenje s hidroskobalaminom ni uspešno. Vzrok je lahko nepravilna diagnoza, odziv pa je nezadosten tudi pri sočasni okužbi, kronični ledvični odpovedi ali ob pomanjkanju železa (2).

Anemijo zaradi pomanjkanja folatov zdravimo z zdravili s folno kislino peroralno v odmerku 1-5 mg/dan. Pri moteni absorpciji ali sočasni kronični bolezni so potrebni višji odmerki, vse do 15 mg na dan. Dokler nimamo normalnega izvida ravni vitamina B12, vedno sočasno zdravimo s hidroskobalaminom, kajti samo s folati lahko delno popravimo krvno sliko, poslabšamo pa nevrološke simptome (7).

Hemolitične anemije zdravimo glede na podvrsto le-te. Hereditarno sferocitozo s splenektomijo (odstranitev vranice), avtoimunsko hemolitično anemijo s kortikosteroidi, imunosupresivnimi zdravili (če poznamo sprožilec potem npr. z ukinitvijo zdravila, zdravljenjem okužb), splenektomijo. Bolezen hladnih aglutininov lahko zdravimo s klorambucilom ali rituksimabom. Vedno dodamo tudi folno kislino (9).

Pri anemijah zaradi kronične bolezni oz. vnetja je bistvenega pomena zdravljenje osnovne bolezni (7). Anemijo začnemo zdraviti pri vrednosti Hb okoli 100 g/L oz. manj, zelena,

ciljana vrednost Hb pa je 110–120 g/L. Zdravimo lahko s transfuzijo krvi, pripravki železa ali eritropoetinom. Pri zdravljenju z železom je potrebno biti previden, saj železo kot esencialno hranilo stimulira proliferacijo mikroorganizmov (bakterij), morda tudi tumorskih celic, hkrati pa zavira tudi celični imunski odgovor (9). Pogoste transfuzije krvi so lahko tvegane zaradi prenosa infektivnih agensov, aloimunizacije in preobremenitve z železom, zato se v zadnjem času uporablja humani rekombinantni eritropoetin (7). Eritropoetin je učinkovit pri do 95% bolnikov s kronično ledvično boleznijo. Začetni odmerek eritropoetina je 50-150 IE/kg/teden. Koncentracijo Hb je potrebno določati vsak teden ali dva po začetku zdravljenja ali po zvečanju oz. zmanjšanju odmerka, dokler ni dosežena ustaljena koncentracija Hb in ustaljen odmerek eritropoetina. Cilj je povečati koncentracijo Hb za 10-20g/L na mesec (8). Če kljub zdravljenju ni ustreznega dviga Hb in če hkrati izključimo pomanjkanje železa, potem odmerek eritropoetina povečamo. Najpogostejši vzrok neodzivnosti na zdravljenje z eritropoetinom je pomanjkanje železa (8,9,26).

Pri zdravljenju aplastične anemije se moramo najprej prepričati, če je bolnik na delovnem mestu ali drugače izpostavljen kemičnim spojinam, ki so lahko vzrok aplastične anemije. Isto velja za zdravila. Ker je avtoimunska motnja poglaviten razlog aplastične anemije, je zdravljenje z imunosupresivi (ciklosporin, glukokortikoidi) uspešno pri 70% pridobljene aplastične anemije (5). Presaditev kostnega mozga privede do izboljšanja pri 60-80% bolnikov (13).

1.5 VREDNOTENJE AKTIVNOSTI KOSTNEGA MOZGA

Aktivnost kostnega mozga lahko določamo s citološkim pregledom kostnega mozga, vendar je postopek zelo invaziven, zato se za določanje aktivnosti kostnega mozga poslužujemo različnih neinvazivnih izračunanih parametrov. Poznavanje aktivnosti kostnega mozga je pomembno predvsem pri:

- diagnozi in zdravljenju anemij
- spremljanju terapije z eritropoetinom
- spremljanju aktivnosti po transplantaciji kostnega mozga
- spremljanju supresije kostnega mozga po kemoterapiji (27)

DELEŽ RETIKULOCITOV

Delež retikulocitov nam poda informacijo o eritropoezni aktivnosti kostnega mozga. Vrednosti v območju 0,5-2% kažejo na to, da je produkcija eritrocitov normalna. Nižja vrednosti povedo, da kostni mozeg ne sintetizira dovolj eritrocitov, kar je lahko posledica pomanjkanja vitamina B12, folne kisline, železa ali bolezni, ki prizadenejo kostni mozeg (rakava obolenja). Delež retikulocitov naraste zaradi povečane aktivnosti kostnega mozga kot odgovor na krvavitev ali zdravljenje anemije. Ker imajo retikulociti kratko življenjsko dobo (18-36h po sprostitvi iz kostnega mozga), ta parameter odraža trenutno stanje eritropoeze v kostnem mozgu.

SINTEZNI RETIKULOCITNI INDEKS (RPI)

Povečan sintezni retikulocitni indeks (RPI) kaže na povečano sintezo rdečih krvnih celic. Kostni mozeg je aktiviran, ker zamenjuje celice, ki smo jih izgubili (krvavitev) oz. so bile uničene (hemoliza). Identifikacija retikulocitov pomaga pri diagnostiki skrite kronične krvavitve ali hemolize (npr. anemija srpastih celic, talasemija). Glavni razlog določanja RPI je razlikovanje med pacienti s funkcionalnim odgovorom kostnega mozga na anemijo in tistimi, ki jim odgovor kostnega mozga odpove. V primeru, da RPI naraste nad 3 v odgovoru na anemijo (Ht<30%), lahko predvidevamo, da ima pacient normalno ledvično funkcijo s primernim odgovorom eritropoetina in normalen kostni mozeg z zadostno zalogo glavnih nutrientov (železo, folna kislina, vitamin B12). Predvidevamo tudi, da je

anemija posledica povečanega propada eritrocitov zaradi hemolize ali izgube zaradi krvavitve. Če je RPI manjši kot 2 pomeni, da kostni mozeg ne sintetizira dovolj eritrocitov.

Vzroki so lahko različni:

- nezdravljena sideropenična anemija, perniciozna anemija
- aplastična anemija
- anemija kroničnih bolezni
- radiacija
- endokrini problemi
- odpoved kostnega mozga
- mielodispastični sindromi
- alkoholizem (11,26)

DELEŽ NEZRELIH RETIKULOCITOV (IRF)

Delež nezrelih retikulocitov (IRF) je podan kot razmerje mladih nezrelih retikulocitov glede na število vseh retikulocitov. Je zgodnji parameter za oceno eritropoezne aktivnosti kostnega mozga. IRF vrednost naraste le nekaj ur po nastopu anemije, medtem ko delež retikulocitov oz. absolutno število retikulocitov šele po 2-3 dneh. Povišane vrednosti so znak povečane eritropoezne aktivnosti. Referenčne vrednosti so odvisne od metode, ki se uporablja za določanje IRF (29).

SERUMSKI TRANSFERINSKI RECEPTORJI (STR)

Določanje serumskih transferinskih receptorjev je pomembno za oceno eritropoezne aktivnosti kostnega mozga. Transferinske receptorje imajo vse telesne celice, največjo koncentracijo pa najdemo na membranah nezrelih celic rdeče vrste. Koncentracija STR je zelo dober diagnostični kazalec stanja s pospešeno eritropoezo, saj je neposredno sorazmeren eritropoetski aktivnosti oziroma količini nezrelih eritrocitov (14).

KOLIČINA HEMOGLOBINA V RETIKULOCITIH (CHr)

Količina Hb v retikulocitih (CHr) je zgodnji kazalec funkcionalnega pomanjkanja železa v kostnem mozgu, saj je življenjska doba retikulocitov v krvi le 1-2 dni. Zaradi pomanjkanja železa nastajajo retikulociti, ki so slabo polnjeni s Hb (hipokromni retikulociti). CHr daje oceno trenutne eritropoezne aktivnosti kostnega mozga. Referenčne vrednosti CHr so 30,0-36,0 pg (19).

DELEŽ HIPOKROMNIH ERITROCITOV (HipoE)

Delež hipokromnih eritrocitov (hipoE) predstavlja delež eritrocitov z MCHC < 280g/L. Ker je življenjska doba eritrocitov okoli 120 dni, daje ta parameter oceno večmesečnega obdobja okrnjene eritropoeze zaradi pomanjkanja železa. Je pozen kazalec eritropoeze in pripomore k odkrivanju absolutnega in funkcionalnega pomanjkanja železa. Delež hipokromnih retikulocitov je pri zdravih posameznikih manjši od 2,5%, pri dializnih bolnikih pa manjši od 5% (19).

2 NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo ovrednotili nove neinvazivne postopke za določanje aktivnosti kostnega mozga. Zanimalo nas bo ali je tudi RPI primeren pokazatelj za prikaz produkcije retikulocitov. Ugotavljali bomo, kako izračunan RPI pokaže aktivnost kostnega mozga. Pogledali bomo, kakšen je ta parameter glede na potek in vrsto anemije. To bomo preverili pri dveh različnih skupinah anemičnih pacientov (dializni in hematološki bolniki) in jih primerjali s kontrolno skupino športnikov, ki imajo normalen oz. bolj aktiven kostni mozeg.

Če bomo domnevo o primernosti RPI potrdili, bi pacientom omogočili hitrejšo in lažjo diagnostiko vrste anemije. Poenostavitev in pospešitev diagnosticiranja namreč omogoča hitrejši začetek terapije in povečuje možnost za ozdravitev ali celo za preživetje.

Hipoteza

RPI je primeren pokazatelj za prikaz produkcije retikulocitov, kar posledično omogoča ustrezno izbiro nadaljnjih raziskav, ki so potrebne pri ugotavljanju vzrokov anemije.

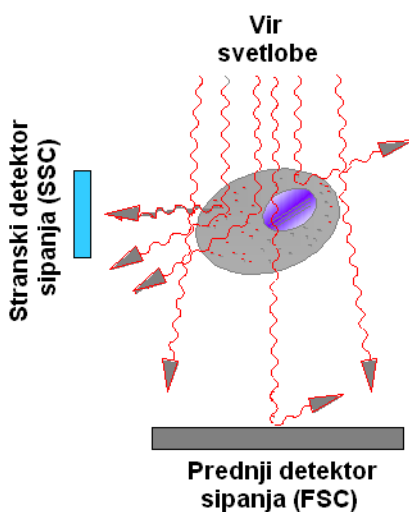
3 MATERIALI IN METODE

3.1 HEMATOLOŠKI ANALIZATOR

Hematološki analizatorji so naprave, ki omogočajo avtomatizirano analizo krvnih celic. Štetje in ocena lastnosti krvnih celic poteka s pomočjo električnih ali optičnih načinov detekcije ali s kombinacijo obeh načinov detekcije.

Merjenje prevodnosti temelji na spoznanju, da krvne celice slabo prevajajo električni tok. Celice v raztopini elektrolita potujejo skozi kapilaro določenega premera in dolžine. Ob zunanji in notranji strani kapilare sta pritrjeni elektrodi. Celice, ki potujejo med elektrodami, povzročijo povečanje električnega upora. Število sprememb upora v enoti časa je sorazmerno številu celic. Velikost spremembe upora je sorazmerna velikosti oziroma posredno volumnu celice. Meritve prevodnosti, kjer gre skozi celico elektromagnetni tok visoke frekvence, dajo informacijo o razmerju jedra in citoplazme, gostoti jedra in zrnih v citoplazmi. Štetje eritrocitov in trombocitov poteka v isti komori, medtem ko analizator šteje levkocite posebej po predhodni odstranitvi eritrocitov s hemolizo. Trombocite loči od eritrocitov na podlagi velikosti, in sicer so trombociti delci manjši od 36fL, eritrociti pa večji od 36fL (15).

Pri optičnih meritvah stalen volumen suspenzije celic potuje iz reakcijske komore v pretočno celico, kamor je usmerjen laserski žarek ali žarek vidne svetlobe (slika 5). Ko celica prečka polje zaznave, jo žarek zadene. Pri tem se žarek na površini celice lomi in razprši (sipa), prehaja skozi celico ali se razprši znotraj celice. Razpršeno ali lomljeno svetlobo lovijo fotodetektorji in jo pretvarjajo v električne impulze. Z merjenjem intenzitete razpršene laserske svetlobe pri nizkem kotu 2-3° določimo velikost oz. volumen celice (FSC – forward light scatter), intenziteta razpršene svetlobe pri visokem kotu 5-15° pa nam poda značilnosti notranje zgradbe celice (oblika jedra, zrnca v citoplazmi, Hb). Analizator meri tudi absorpcijo laserske svetlobe, ki je osnova za razdelitev retikulocitov po zrelosti glede na količino RNA (15, 19).



Slika 5: Shema optične meritve hematološkega analizatorja

Hematološki analizator Advia 120 (slika 6) omogoča analizo kompletne krvne slike na osnovi optičnih meritev sipanja svetlobe in citokemičnega barvanja (21).

Parametri, ki jih lahko določamo:

- številčne koncentracije eritrocitov, levkocitov, trombocitov
- diferencialna bela slika: delež in absolutno število nevtrofilcev, limfocitov, monocitov, eozinofilcev, bazofilcev, velikih neobarvanih celic
- koncentracija Hb
- Ht
- eritrocitni indeksi: MCV, MCH, MCHC
- RDW (koeficient variacije volumna eritrocitov)
- številčna koncentracija in delež retikulocitov
- retikulocitni parametri
- trombocitni parametri
- nekatere morfološke značilnosti (22)



Slika 6: Hematološki analizator ADVIA 120

Pred analizo preverimo delovanje aparata s kontrolnimi vzorci znanih vrednosti za belo, rdečo in trombocitno krvno sliko. Če rezultati kontrolnih vzorcev ustrezajo vrednostim, ki jih predpisuje proizvajalec, lahko začnemo z meritvami. Vzorec predstavlja kri, ki jo odvezamemo v epruvete z EDTA. Po končani meritvi se vrednosti krvne slike izpišejo skupaj z izrisom grafične predstavitev levkocitov, eritrocitov in trombocitov (15).

Analiza eritrocitov

Celice se zaradi prisotnosti površinsko aktivnih snovi (Na dodecil sulfat), ki jih analizator doda vzorcu, spremenijo iz diskoidne v okroglo obliko, pri čemer ostane volumen celic nespremenjen. Nato aparat meri sipanje laserske svetlobe (670 nm) pod velikim kotom (5-15°), ki nam pove koncentracijo Hb in sipanje svetlobe pod majhnim kotom (2-3°), ki kaže volumen eritrocitov (18).

Koncentracijo Hb v celici določajo analizatorji fotometrično s hemiglobincianidno metodo. Kri najprej razredči s hipotonično raztopino (Drabkinovim reagentom), da pride do hemolize eritrocitov in sproščanja hemoglobina. Drabkinov reagent vsebuje dve spojini, ki reagirata s hemoglobinom: $K_3Fe(CN)_6$ in KCN. Reakcija poteka dvostopenjsko. Najprej se oksidira hemoglobin, nato pa se na nastali methemoglobin veže cianidna skupina. Nastane rdeče obarvan produkt, ki ga analizator meri fotometrično pri valovni dolžini 540 nm (16).

Eritrocitni indeksi nam povedo, kakšna je velikost in obarvanost eritrocitov oz. kolikšna je koncentracija Hb v eritrocitu, zato so pomembni pri opredelitvi vrste anemij. Hematološki analizatorji direktno izmerijo povprečen volumen eritrocitov (MCV), medtem ko hematokritno vrednost (enačba 1), povprečno količino Hb v eritrocitu (MCH) (enačba 2) in povprečno koncentracijo Hb v eritrocitu (MCHC) (enačba 3) izračunajo (17).

$$Ht = MCV \times \text{št.erc} \quad (\text{enačba 1})$$

$$MCH = \frac{Hb}{\text{št.erc}} \quad (\text{enačba 2})$$

$$MCHC = \frac{Hb}{Ht} \quad (\text{enačba 3})$$

RDW (koeficient variacije volumna eritrocitov) nam pokaže razporeditev eritrocitov v krvi glede na velikost njihovega volumna. Hematološki števec izriše krivuljo porazdelitve eritrocitov po njihovih volumnih, izračuna MCV in standardni odklon. Iz teh vrednosti izračuna koeficient variacije, ki se izrazi v odstotkih (16,17). Uporaben je kot zgodnji kazalec predvsem anemij zaradi pomanjkanja železa, saj se njegove vrednosti hitreje spreminjajo kot vrednosti nekaterih drugih parametrov (10).

Analiza retikulocitov

Retikulociti so nezreli eritrociti, ki še vsebujejo ostanke RNA, medtem ko jih eritrociti ne. To je glavna lastnost, ki loči eritrocite od retikulocitov. Analiza temelji na merjenju absorbance ali fluorescence, odvisno od vrste barvila. Pri metodah, ki temeljijo na absorbanci, uporabljamo barvila oksazin 750 ali metilensko modro. V našem primeru hematološki analizator ADVIA 120 doda barvilo oksazin 750. Retikulociti se z barvilom obarvajo, medtem ko se eritrociti ne, ker ne vsebujejo RNA. Pri fluorescentnih metodah uporabljamo fluorescentna barvila kot so tiazol oranžno, auramin ali cianidna barvila. Na podlagi fluorescence lahko poleg ločitve retikulocitov od eritrocitov, določamo tudi

retikulocitne podskupine glede na zrelost. Nezreli retikulociti imajo večjo fluorescenco kot zreli, ker vsebujejo več RNA (23).

Naprava poda rezultat analize retikulocitov kot delež retikulocitov glede na število eritrocitov in kot številčno koncentracijo retikulocitov. Poleg teh parametrov smo s hematološkim analizatorjem določili tudi koncentracijo Hb, Ht, MCV ter številčno koncentracijo eritrocitov.

3.2 IZRAČUN SINTEZNEGA RETIKULOCITNEGA INDEKSA (RPI)

Delež retikulocitov je še vedno najpogostejši parameter, ki se uporablja za spremljanje aktivnosti kostnega mozga (23). Prikazuje število retikulocitov glede na število eritrocitov, zato je delež retikulocitov pri anemičnih bolnikih lahko lažno povečan, saj imajo ti manjše število eritrocitov.

Sintezni retikulocitni indeks (RPI) pa predstavlja korigiran delež retikulocitov. Korekcija poleg stopnje anemije (spremembe v hematokritu) (enačba 4) upošteva tudi podaljšan čas dozorevanja retikulocitov (enačba 5). Pri hudo anemičnih bolnikih v plazmi naraste količina eritropoetina, ki pospeši eritropoezo. Povečana količina retikulocitov v krvi pa ni samo posledica povečane eritropoeze, ampak tudi daljšega dozorevanja retikulocitov, ker se ti iz kostnega mozga v kri sprostijo manj zreli. Normalno retikulociti izgubijo svojo RNA (dozorijo v eritrocit) v 24 urah, pri pacientih s hudo anemijo in eritropoetskim odgovorom pa dozorevanje traja tudi do 3 dni. To upošteva faktor korekcije, ki predstavlja število dni dozorevanja retikulocita (preglednica III) (23, 24, 25).

$$\text{korigirano št. RET} = \text{RET}\% \times \frac{\text{Ht}}{45} \quad (\text{enačba 4})$$

$$\text{RPI} = \frac{\text{korigirano št. RET}}{\text{faktor korekcije}} = \text{RET}\% \times \frac{\text{Ht}}{45} \times \frac{1}{\text{faktor korekcije}} \quad (\text{enačba 5})$$

Preglednica III: Faktorji korekcije glede na hematokrit

Ht	faktor korekcije
0,40-0,45	1
0,35-0,39	1,5
0,25-0,34	2
0,15-0,24	2,5
< 0,15	3

3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Za analizo pridobljenih podatkov smo uporabili programski paket SPSS za Windows, verzija 17.0 Normalnost porazdelitve posameznih spremenljivk (Hb, MCV in RPI) smo preverili s Kolmogorov-Smirnovim testom. V primeru da so P vrednosti večje od 0,05, potrdimo normalno porazdeljevanje spremenljivk, v nasprotnem primeru se spremenljivke ne porazdeljujejo statistično značilno normalno.

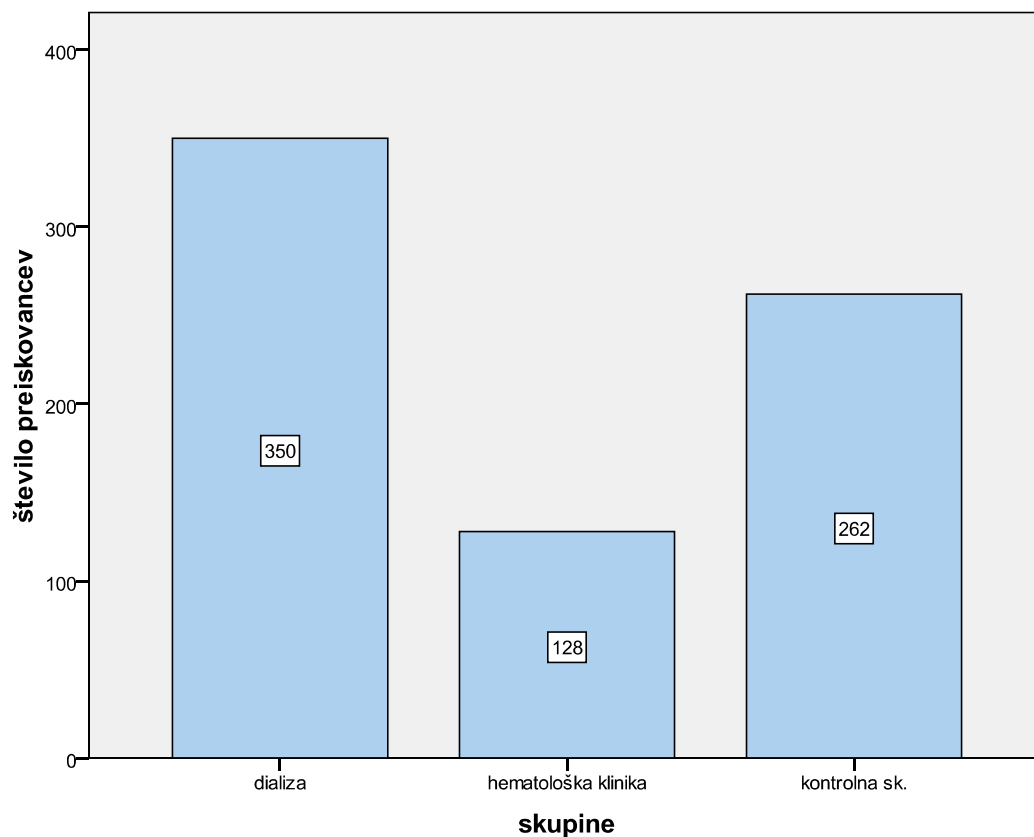
V nadaljevanju smo za spremenljivke, ki se ne porazdeljujejo statistično značilno normalno, uporabili neparametrične teste, in sicer Kruskal-Wallisov test za več neodvisnih spremenljivk. S tem testom smo preverili ali se skupine med sabo statistično razlikujejo glede na RPI, Hb in MCV. Zanimalo nas je tudi ali se posamezni pari skupin med sabo statistično razlikujejo, kar smo preverili z neparametričnim Mann-Whitneyevim testom za 2 neodvisni spremenljivki. Upoštevali smo še Holm-Bonferronijevo korekcijo, in sicer smo P vrednosti iz Mann-Whitneyevega testa razvrstili po velikosti, nato pa smo najmanjšo P vrednost primerjali z α/k . V primeru, da so bile P vrednosti manjše od α/k , smo lahko potrdili statistično značilno razliko med skupinama in nadaljevali s primerjavo naslednje P vrednosti z $\alpha/k-1$. Tako smo nadaljevali, dokler so bile P vrednosti manjše oz. smo lahko potrdili statistično značilno razliko med skupinama. Stopnja tveganja (α) je 0,05, k pa predstavlja število skupin.

Za ugotavljanje ujemanja med RPI in absolutnim številom retikulocitov smo uporabili Spearmanov koeficint koreacije, ki prikazuje stopnjo povezanosti dveh spremenljivk, ki se ne porazdeljujeta normalno. Ta parameter zavzema vrednosti od 0 do $+1/-1$, pri čemer 0 pomeni, da povezanosti med spremenljivkama ni, $+1/-1$ pa, da je povezanost odlična. Ujemanje je pozitivno (premosorazmerno), če so vrednosti Spearmanovega koeficienta pozitivne, in negativno (obratnosorazmerno), če so vrednosti negativne.

4 REZULTATI

4.1 OPIS SKUPIN

V analizo smo vključili 478 bolnikov, ki so bili na zdravljenju v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana od oktobra do decembra 2009. Razdelili smo jih v 2 skupini, in sicer na dializne in hematološke bolnike. V skupino dializnih bolnikov smo vključili 350 preiskovancev s povprečno starostjo 63,9 let, in sicer od minimalne starosti 24 let do maksimalne 64 let. V skupini hematoloških bolnikov je bilo 128 preiskovancev s povprečno starostjo 10 let. Najmlajši je imel 1 leto, najstarejši pa 86 let. Kontrolno skupino je sestavljalo 262 športnikov (graf 1).

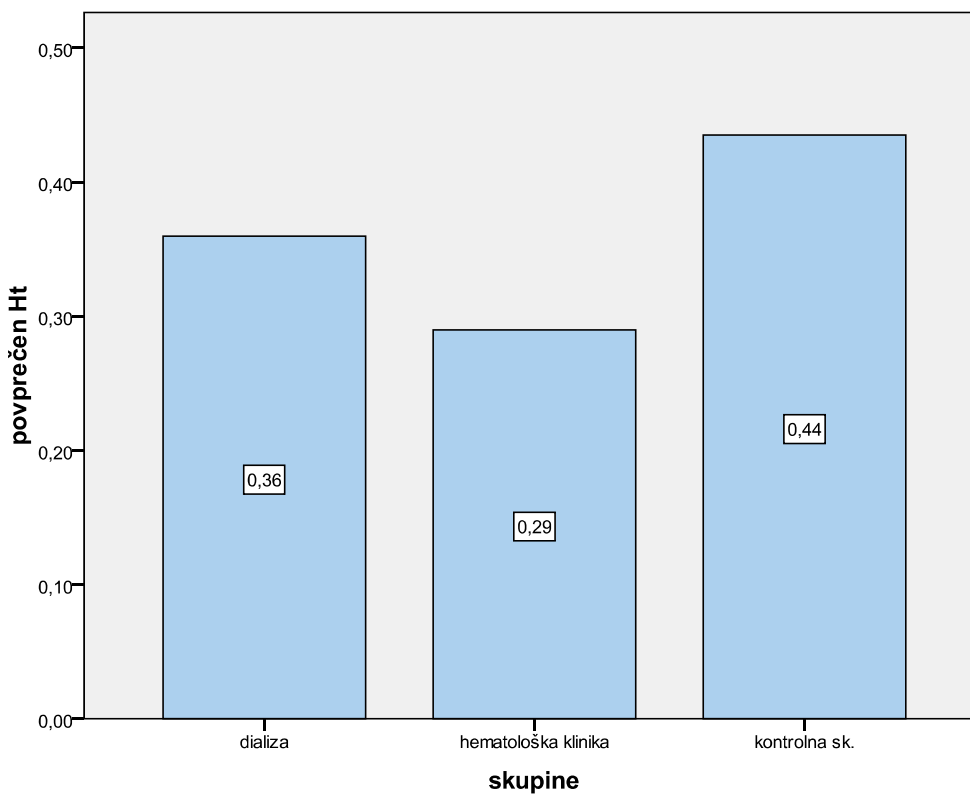


Graf 1: Število preiskovancev glede na posamezno skupino

Analize so opravili v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana. Vsem preiskovancem so v serumu izmerili naslednje parametre: Hb, Ht, MCV, številčno koncentracijo retikulocitov, delež retikulocitov in številčno koncentracijo eritrocitov. V preglednici IV so podane povprečne vrednosti izmerjenih parametrov, povprečna vrednost izračunanega RPI in standardne deviacije parametrov.

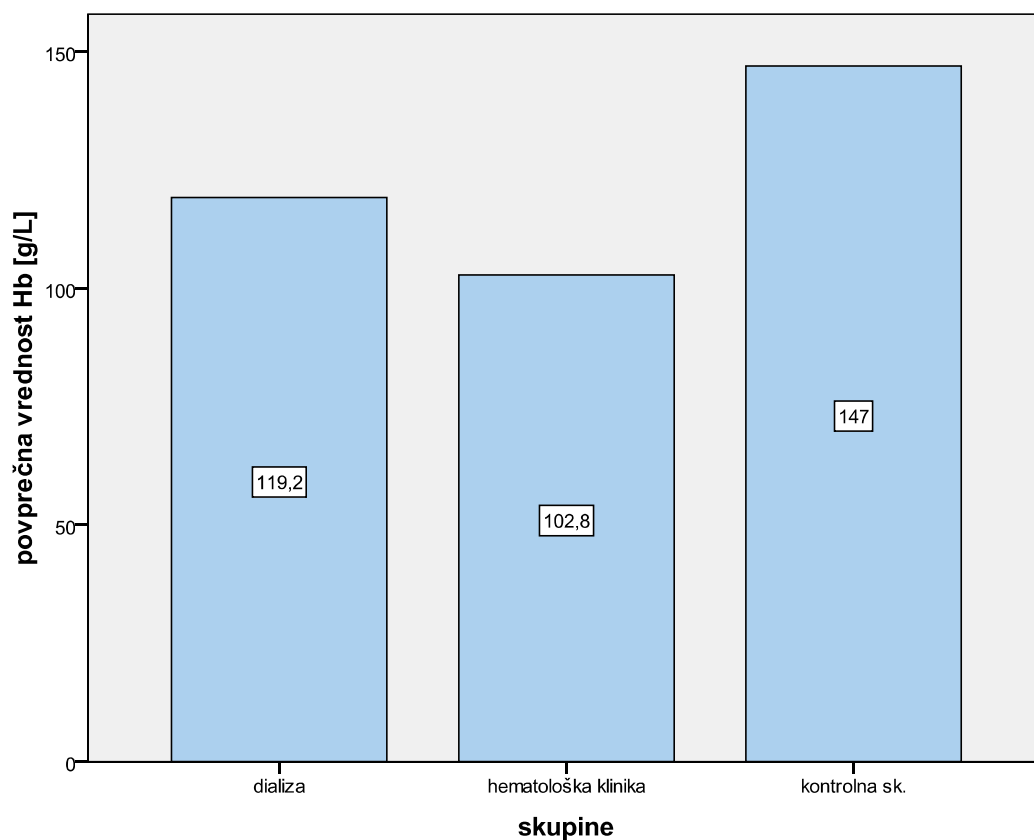
Preglednica IV: Prikaz povprečnih vrednosti in standardnih deviacij (SD) parametrov za posamezne skupine

	dializa		hematološka klinika		kontrolna skupina	
	povpr.vr.	SD	povpr.vr.	SD	povpr.vr.	SD
RPI	0,67	0,43	0,46	0,51	0,98	0,41
Hb (g/L)	119	12	103	19	147	12
Ht	0,36	0,04	0,29	0,06	0,44	0,03
MCV (fL)	94,73	6,2	82,2	5,5	88,5	3,7
RET ($\times 10^6/L$)	47,1	26,26	45,9	48,8	51,5	19,9
RET delež (%)	1,25	0,72	1,37	1,52	1,06	0,44
ERC ($\times 10^9/L$)	3,80	0,42	3,54	0,75	4,93	0,44



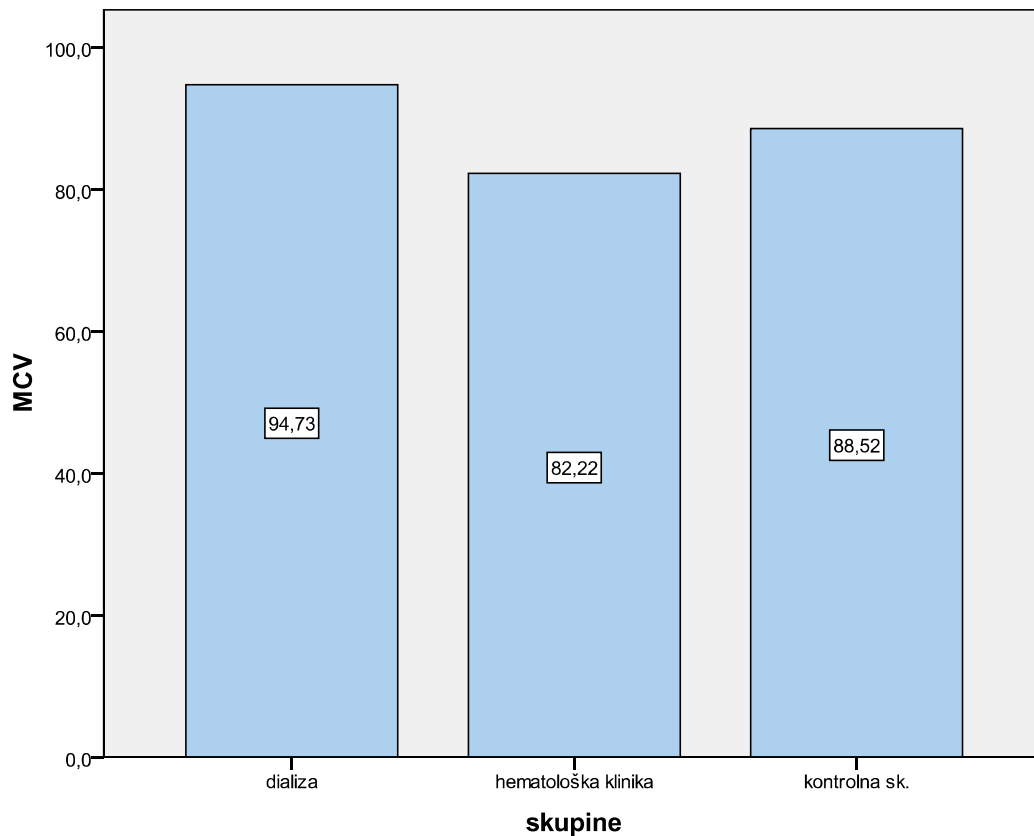
Graf 2: Povprečne vrednosti Ht za posamezne skupine

Iz grafa 2 je razvidno, da je povprečna vrednost Ht kontrolne skupine 0,44, kar je v mejah referenčnih vrednosti (0,37-0,54). Kot smo pričakovali imajo bolniki znižan Ht, in sicer dializni bolniki 0,36, hematološki pa 0,29. Pri dializnih bolnikih so vrednosti Ht v intervalu od 0,27 do 0,43, pri hematoloških od 0,12 do 0,44, medtem ko so vrednosti Ht kontrolne skupine od 0,32 do 0,50.



Graf 3: *Povprečne vrednosti Hb za posamezne skupine*

Povprečna vrednost Hb pri bolnikih je pod referenčno mejo (120-180 g/L), in sicer pri dializnih bolnikih je 119,2 g/L, pri hematoloških pa 102,8 g/L (graf3). Pri kontrolni skupini zdravih pacientov je vrednost 147 g/L. V skupini hematoloških bolnikov je največje šipanje podatkov okrog povprečne vrednosti, in sicer od minimalne vrednosti Hb 42 do maksimalne 150 g/L. Pri dializnih bolnikih so vrednosti v intervalu od 82 do 157 g/L, medtem ko so pri kontrolni skupini v intervalu od 100 do 175 g/L.

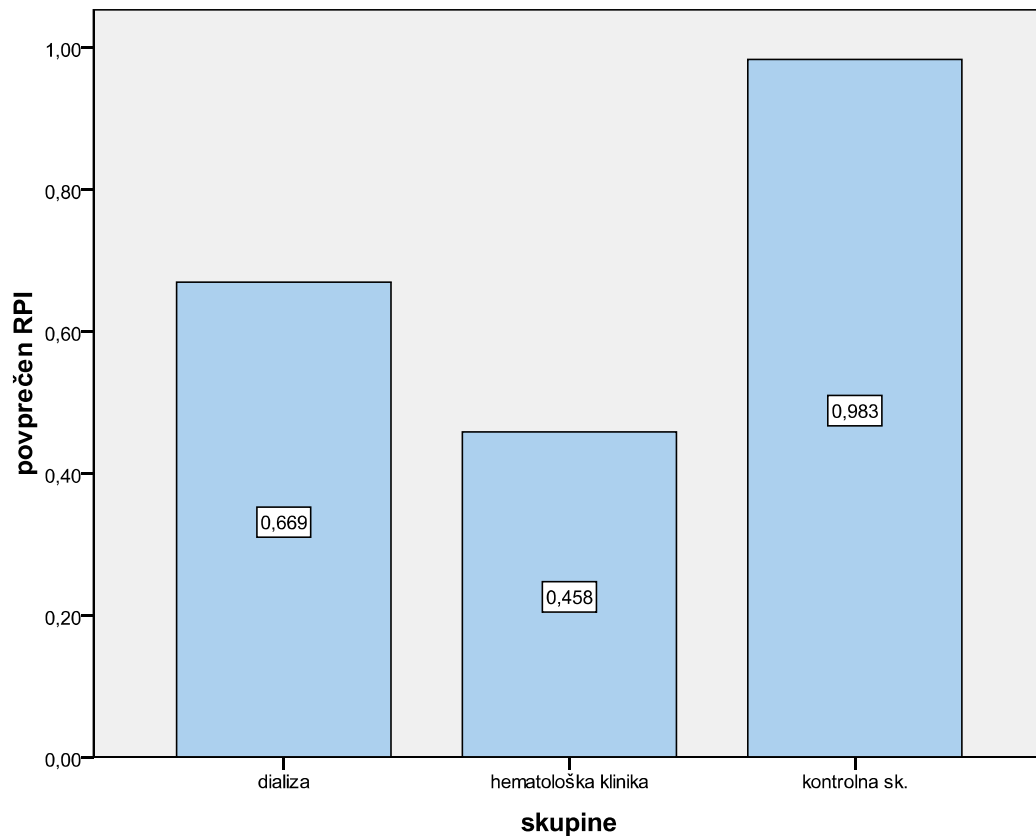


Graf 4: *Povprečne vrednosti MCV glede na posamezne skupine*

Referenčne vrednosti MCV so 81-94 fL. Kot je razvidno iz grafa 4 imajo dializni bolniki v povprečju makrocitne eritrocite (MCV 94,74 fL), vendar vrednosti precej sipajo okoli povprečja (74,5-123,1 fL) (preglednica V). Hematološki bolniki imajo manjše eritrocite. MCV je na spodnji meji referenčnih vrednosti (82,2 fL), medtem ko je MCV kontrolne skupine v mejah normale 88,5 fL.

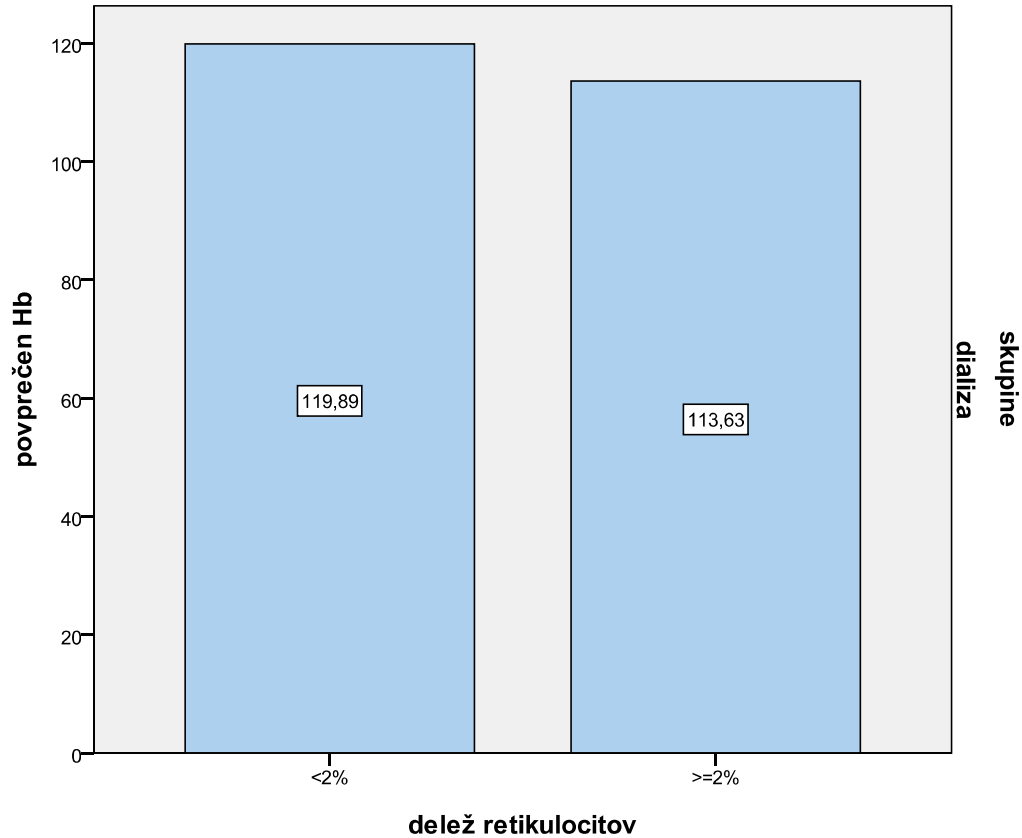
Preglednica V: *Minimalne in maksimalne vrednosti MCV glede na posamezno skupino*

skupina	min. MCV (fL)	max. MCV (fL)
dializni bolniki	74,5	123,1
hematološki bolniki	71,0	97,0
kontrolna skupina	77,0	100,9



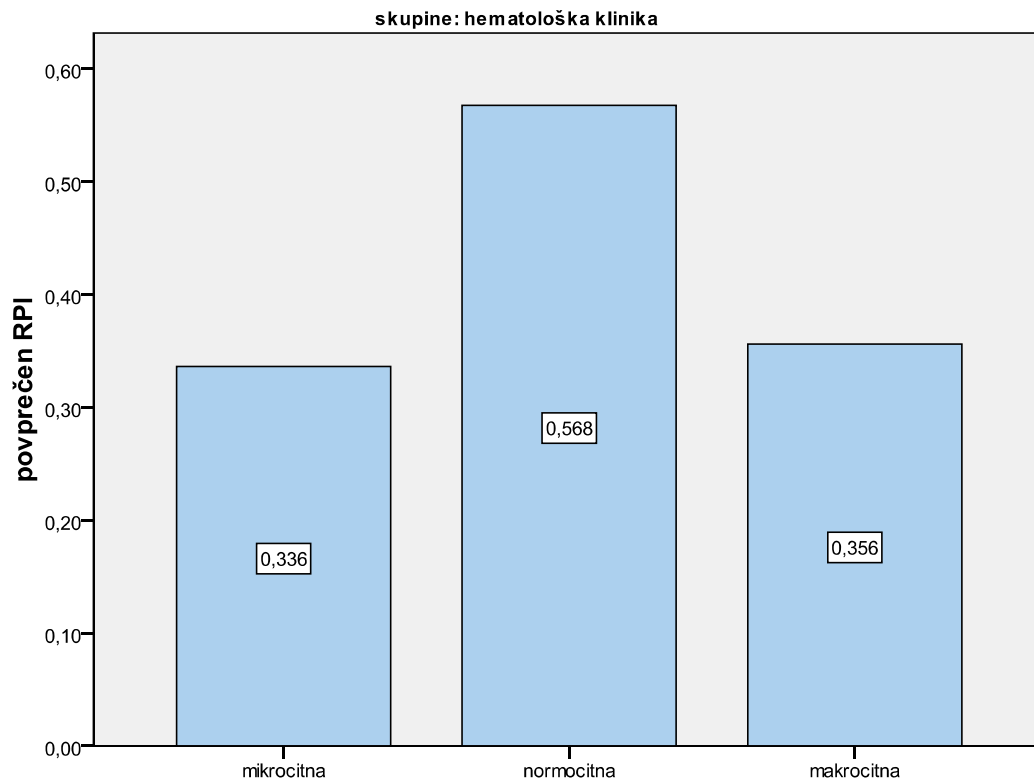
Graf 5: *Povprečne vrednosti RPI glede na posamezno skupino*

Iz grafa 5 lahko razberemo, da je povprečna vrednost RPI kontrolne skupine 0,98, kar ustreza referenčni meji zdravih neanemičnih ljudi, ki imajo RPI med 1 in 2. Iz vzorcev odvzetih bolnikom na hematološki kliniki in na dializi je razvidno, da je njihova povprečna vrednost RPI bistveno manjša od kontrolne skupine. Iz grafa je tudi razvidno, da imajo hematološki bolniki nižji RPI (0,67) kot dializni bolniki (0,46). Vrednosti RPI dializnih bolnikov so med 0,11 in 3,64, hematoloških pa od 0,02 do 2,39.



Graf 6: Povprečne vrednosti Hb v skupini dializnih bolnikov glede na retikulocitni delež

Povprečna vrednost Hb pri dializnih bolnikih z eritrocitnim deležem manjšim kot 2% je 119,89 g/L, pri dializnih bolnikih z eritrocitnim deležem večjim kot 2% pa je nekoliko nižja in znaša 113,63 g/L (graf 6).



Graf 7: *Povprečna vrednost RPI glede na vrsto anemije v skupini hematoloških bolnikov*

Vrednosti RPI so v skupini hematoloških bolnikov močno znižane (manjše kot 1). Bolniki z normalno velikostjo eritrocitov (normocitni bolniki) imajo vrednost RPI 0,568, medtem ko imajo mikrocitni in makrocitni bolniki RPI še nižji - ta znaša pri prvih 0,336, pri drugih pa 0,356 (graf 7).

4.2 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Preglednica VI: Normalnost porazdelitve spremenljivk RPI, Hb in MCV

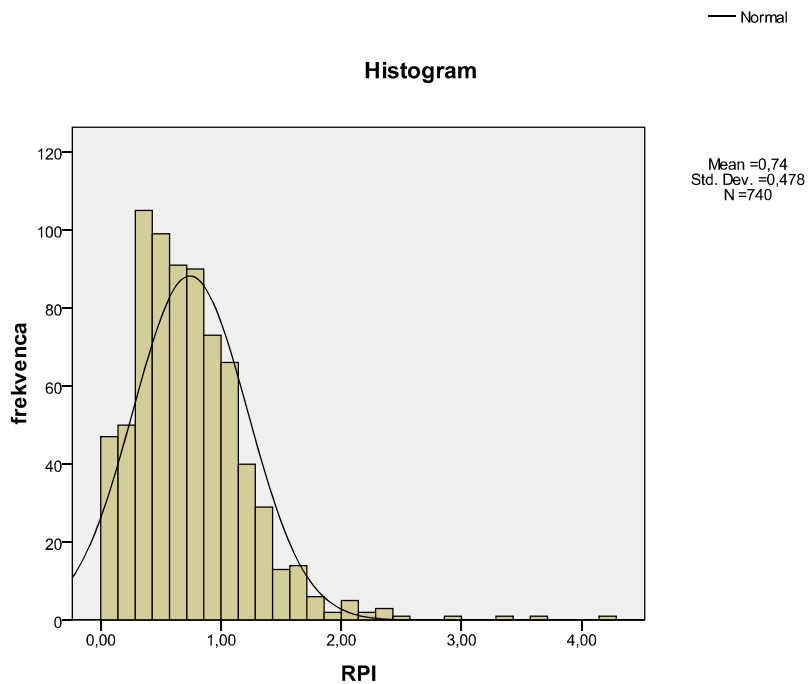
	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
RPI	,067	740	,000
Hb	,035	740	,030
MCV	,040	740	,007

a. Lilliefors Significance Correction

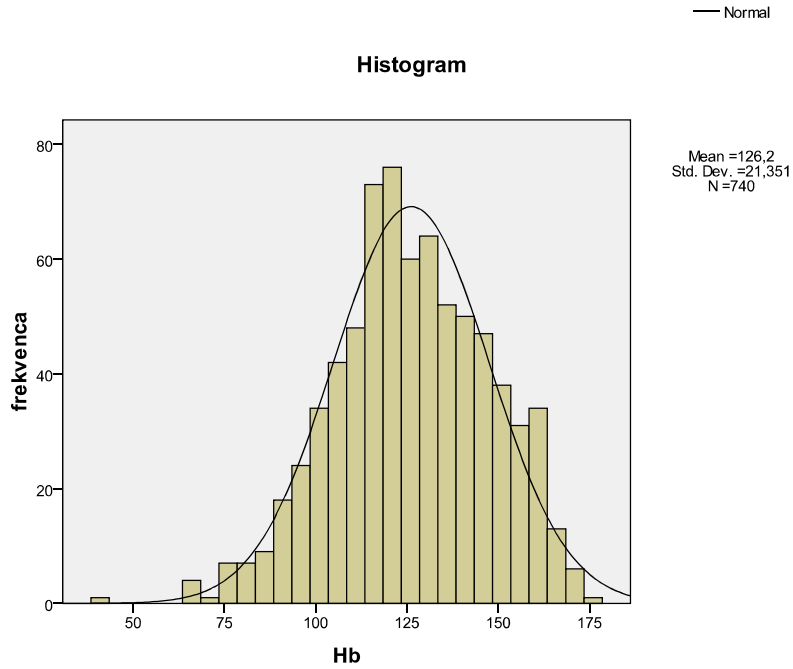
Ho: Spremenljivka se porazdeljuje normalno.

Ha: Spremenljivka se ne porazdeljuje normalno.

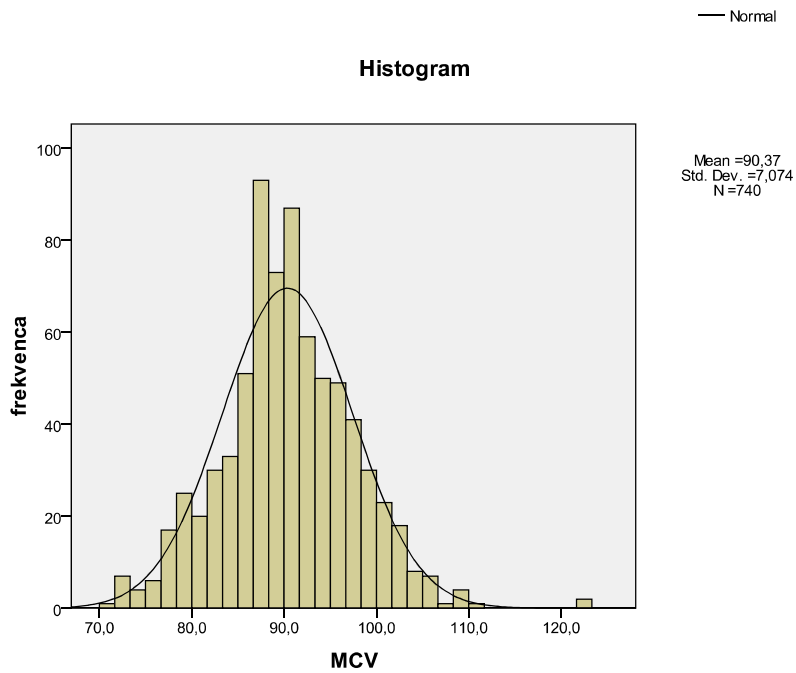
Ker so vrednosti $p < 0,05$ (preglednica VI) pri vseh treh spremenljivkah, lahko v vseh treh primerih zavrnemo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno. Ugotovili smo, da se vse tri spremenljivke RPI, Hb in MCV ne porazdeljujejo statistično značilno normalno, kar je razvidno tudi iz grafov 8-10.



Graf 8: Histogram normalnosti porazdelitve RPI



Graf 9: *Histogram normalnosti porazdelitve Hb*



Graf 10: *Histogram normalnosti porazdelitve MCV*

Ker se spremenljivke ne porazdeljujejo statistično značilno normalno smo v nadaljevanju uporabili neparametrični Kruskal-Wallisov test za več neodvisnih spremenljivk. Preverili smo ali se skupine med sabo statistično razlikujejo glede na RPI, Hb in MCV.

Preglednica VII: *Rezultati Kruskal-Wallis-ovega testa*

Ranks			
skupine	N	Mean Rank	
RPI	dializa	350	328,71
	hematološka klinika	128	204,98
	kontrolna sk.	262	507,19
	Total	740	
Hb	dializa	350	286,20
	hematološka klinika	128	155,83
	kontrolna sk.	262	588,00
	Total	740	
MCV	dializa	350	509,34
	hematološka klinika	128	132,98
	kontrolna sk.	262	301,07
	Total	740	

Test Statistics ^{a,b}			
	RPI	Hb	MCV
Chi-Square	197,271	454,870	333,323
df	2	2	2
Asymp. Sig.	,000	,000	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: skupine

Ugotovili smo, da se skupine med seboj statistično razlikujejo glede na RPI, Hb in MCV, saj so p vrednosti manjše od 0,05 (preglednica VII).

Z Man-Whitneyevim testom smo želeli ugotoviti, če obstajajo kakšne razlike med posameznimi skupinami. Iz preglednice VIII razberemo, da so vrednosti P povsod manjše kot 0,05, kar pomeni, da se vse možne kombinacije skupin med seboj statistično razlikujejo glede na RPI, Hb in MCV. Vendar je potrebna še korekcija Mann-Whitneyevega testa s Holm-Bonferroni testom.

Preglednica VIII: Rezultati Man-Whitneyevega testa

	P vrednosti		
	RPI	Hb	MCV
hematološka skupina – dializna	$1,75 \cdot 10^{-12}$	$8,75 \cdot 10^{-18}$	$8,68 \cdot 10^{-48}$
dializna – kontrolna	$1,04 \cdot 10^{-28}$	$5,20 \cdot 10^{-80}$	$2,08 \cdot 10^{-41}$
hematološka skupina - kontrolna	$2,4 \cdot 10^{-29}$	$7,22 \cdot 10^{-53}$	$8,04 \cdot 10^{-26}$

Holm-Bonferroni test

P vrednosti smo razvrstili po velikosti, nato pa smo najmanjšo P vrednost primerjali z $\frac{\alpha}{k}$,

naslednjo z $\frac{\alpha}{k-1}$, največjo pa z α . Stopnja tveganja (α) je 0,05.

Preglednica IX: Rezultati Holm-Bonferronijevega testa glede na RPI

	P (RPI)		
hematološka – kontrolna	$2,4 \cdot 10^{-29}$	< 0,05/3	statistično značilna razlika
dializna – kontrolna	$1,04 \cdot 10^{-28}$	< 0,05/2	statistično značilna razlika
hematološka – dializna	$1,75 \cdot 10^{-12}$	< 0,05	statistično značilna razlika

Preglednica X: Rezultati Holm-Bonferronijevega testa glede na Hb

	P (Hb)		
dializna – kontrolna	$5,20 \cdot 10^{-80}$	< 0,05/3	statistično značilna razlika
hematološka – kontrolna	$7,22 \cdot 10^{-53}$	< 0,05/2	statistično značilna razlika
hematološka – dializna	$8,75 \cdot 10^{-18}$	< 0,05	statistično značilna razlika

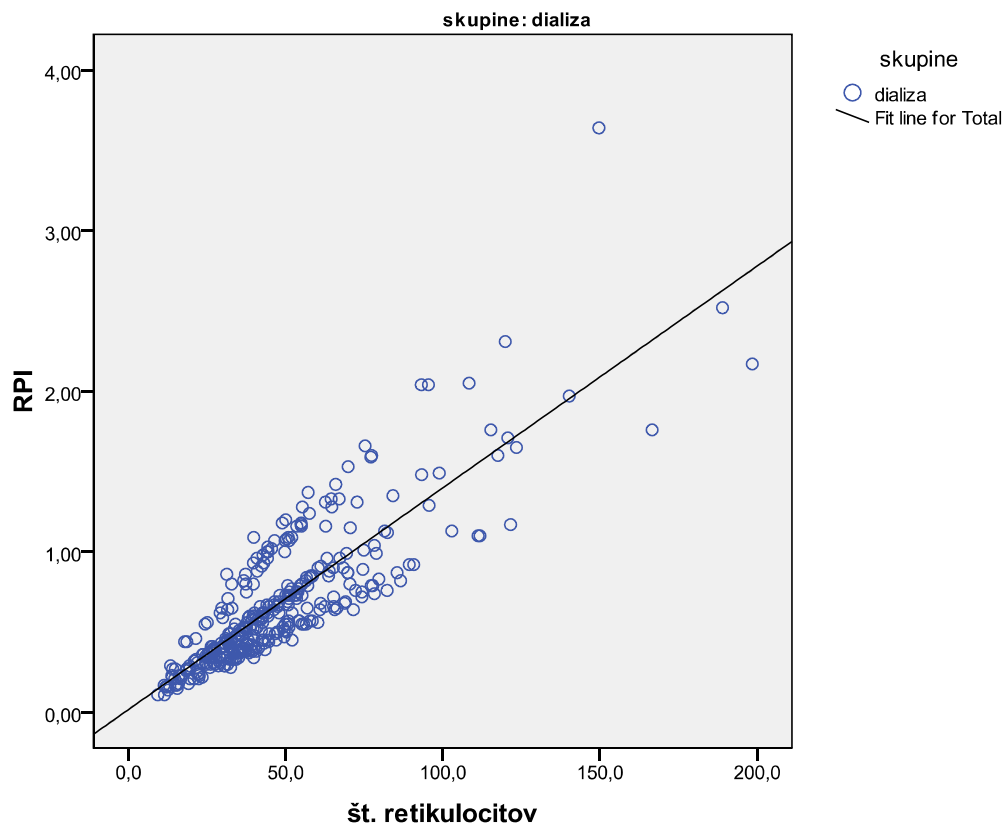
Preglednica XI: Rezultati Holm-Bonferronijevega testa glede na MCV

	P (MCV)		
hematološka – dializna	$8,68 \cdot 10^{-48}$	< 0,05/3	statistično značilna razlika
dializna – kontrolna	$2,08 \cdot 10^{-41}$	< 0,05/2	statistično značilna razlika
hematološka – kontrolna	$8,04 \cdot 10^{-26}$	< 0,05	statistično značilna razlika

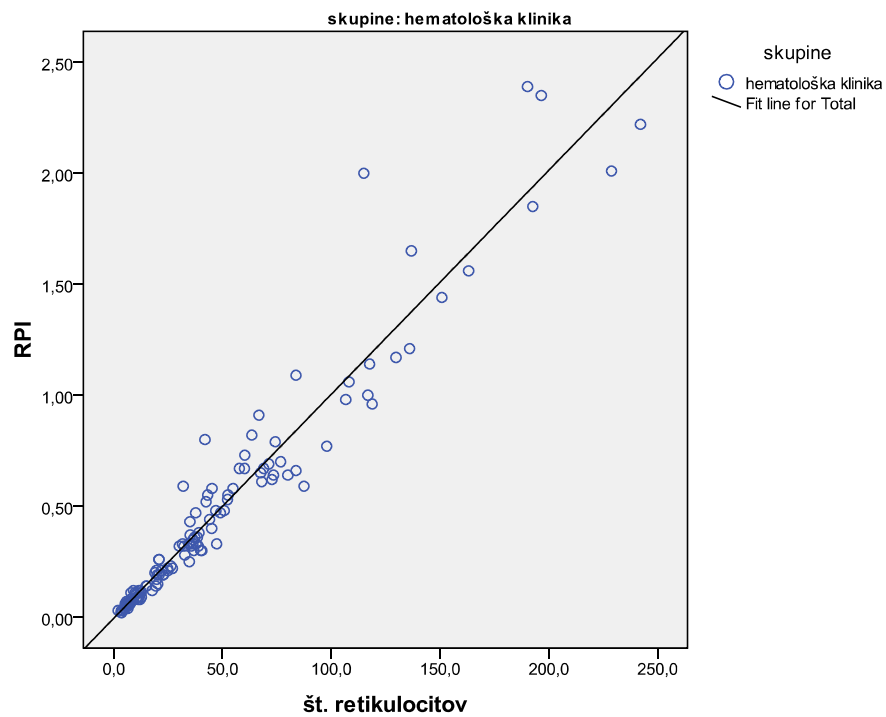
Iz preglednic IX, X, XI je razvidno, da obstaja statistično značilna razlika med vsemi možnimi kombinacijami skupin glede na RPI, Hb in MCV.

4.3 KORELACIJA MED RPI IN ABSOLUTNIM ŠTEVILOM RETIKULOCITOV

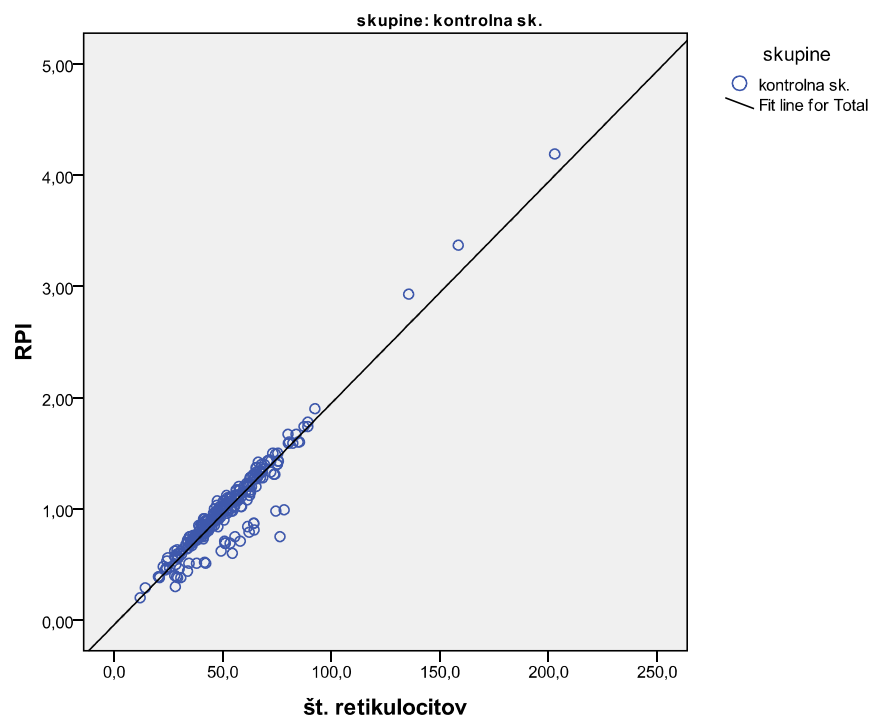
V raziskavi smo analizirali korelacijo med RPI in standardnim parametrom za določanje aktivnosti kostnega mozga. Na grafih 8-10 so tako prikazane korelacije med RPI in absolutnim številom retikulocitov za posamezne skupine bolnikov in kontrolno skupino.



Graf 11: Korelacija med RPI in absolutnim številom retikulocitov v skupini dializnih bolnikov



Graf 12: Korelacija med RPI in absolutnim številom retikulocitov v skupini hematoloških bolnikov



Graf 13: Korelacija med RPI in absolutnim številom retikulocitov v kontrolni skupini

Iz grafov 11-13 in preglednice XII je razvidno, da je korelacija med RPI in absolutnim številom retikulocitov pri stopnji tveganja 0,01 signifikantna v vseh treh skupinah. P vrednosti so manjše od 0,05. Gre za močno pozitivno ujemanje med RPI in absolutnim številom retikulocitov, kar pomeni da večji kot je RPI, večje je število retikulocitov. Najmočnejša korelacija je v skupini hematoloških bolnikov, najmanjša pa pri dializnih bolnikih. Spearmanovi koeficienti in P vrednosti so zbrani v preglednici XII.

Preglednica XII: *Korelacija med RPI in retikulociti za posamezne skupine*

korelacija RPI-ErcRET	Spearmanov koef.	p
DIALIZA	0,864	< 0,0005
HEMATOLOŠKA KLINIKA	0,982	< 0,0005
KONTROLNA SKUPINA	0,907	< 0,0005

5 RAZPRAVA

Število retikulocitov je parameter, ki odseva eritropoezno aktivnost kostnega mozga in je uporaben pri določanju vzroka in vrste anemije ter pri spremljanju odgovora kostnega mozga na terapijo. RPI vrednost pa korigira število retikulocitov. Poleg korekcije hematokrita upošteva tudi podaljšan čas dozorevanja retikulocitov, zato bi bil bolj primeren pokazatelj aktivnosti kostnega mozga. V diplomski nalogi smo ugotavljali, kako izračunan sintezni retikulocitni indeks (RPI) pokaže aktivnost kostnega mozga. Pogledali smo, kakšen je ta parameter glede na potek in vrsto anemije ter kakšna je korelacija med tem parametrom in številom retikulocitov.

Iz rezultatov je razvidno, da imajo hematološki in dializni bolniki RPI vrednost znižano (graf 5). To kaže na neustrezen odgovor kostnega mozga na anemijo. Vzroki so lahko različni. Pri dializnih bolnikih je vzrok anemija zaradi odpovedi ledvic, zmanjšane sinteze eritropoetina in posledično zaradi zmanjšanega signala za eritropoezo ni zadostne sinteze retikulocitov. Stopnja anemije korelira s stopnjo odpovedi ledvic. Zaradi diete in povečanih izgub s hemodializo lahko pride tudi do pomanjkanja železa, beljakovin in folne kisline, ki so nujni za sintezo Hb in retikulocitov. Pri pomanjkanju teh nutrientov je zmanjšana sinteza retikulocitov oz. RPI, ravno tako Hb (graf 3). Pri bolnikih, ki so bili sprejeti na hematološko kliniko, je anemija še močnejše izražena. Povprečna vrednost Hb je 102,8 g/L, sinteza novih retikulocitov je bolj zavrt. RPI vrednost je nižja kot pri dializnih bolnikih, zaradi krvnih bolezni (levkemije, limfomi), odpovedi kostnega mozga, pomanjkanja nutrientov. Ravno tako so nekateri dializni bolniki na terapiji z eritropoetinom, ki stimulira sintezo novih retikulocitov, zato so vrednosti RPI v tej skupini višje kot v skupini hematoloških bolnikov.

Z raziskavo smo ugotovili, da je RPI bolnikov na hematološki kliniki močno znižan. Glede na velikost eritrocitov je RPI najbolj znižan pri mikrocitnih in makrocitnih anemijah, nekoliko manj pri normocitnih. Pri mikrocitnih anemijah je RPI močno znižan (0,336), ker kostni mozeg ne more tvoriti novih retikulocitov zaradi pomanjkanja glavnih gradnikov Hb oz. retikulocitov. Lahko gre za pomanjkanje železa (sideropenična anemija), motnje v izkoriščanju železa (sideroblastne anemije), ki lahko spremljajo hematološke bolnike s

karcinomskimi metastazami ali pa za motnje v sintezi hema ali globina (talasemije). Vzrok za znižan RPI pri makrocitnih anemijah (0,356) je najverjetneje pomanjkanje folne kisline ali zdravljenje s citostatiki. To povzroči motnje v sintezi DNA, kar prizadane oz. moti razvoj eritroblastov, zato nastaja manj novih retikulocitov. Pri normocitni anemiji je kostni mozeg nekoliko aktivnejši (RPI 0,568), vendar je sinteza novih retikulocitov še vedno zelo nizka, kar je lahko posledica infiltracije kostnega mozga z rakastimi celicami ali celicami druge vrste (vnetne celice, vezivo). To spremeni zgradbo kostnega mozga, moti razvoj krvnih celic in njihovo izplavljanje v kri (1).

Pri dializnih bolnikih je cilj terapije vzdrževati vrednost Hb nad 110 g/L, in sicer s pravilno prehrano in z zdravili z železom, ki omogočajo sintezo Hb. Če pa to ni dovolj pa še z dodajanjem eritropoetina. Ta stimulira sintezo retikulocitov, zato je vrednost Hb pri dializnih bolnikih (119,2 g/L) večja kot pri hematoloških (102,8 g/L). Referenčne vrednosti retikulocitov so 0,6-2%. Iz grafa 6 lahko sklepamo, da so bolniki z eritrocitnim deležem večjim od 2% najverjetneje na terapiji z eritropoetinom, ki stimulira sintezo novih retikulocitov. Vrednost Hb je še vedno znižana, kar pomeni, da kompenzacija ni zadostna, vendar je cilj terapije z eritropoetinom vzdrževati vrednost Hb nad 110 g/L, tako da je terapija uspešna. Bolniki z eritrocitnim deležem manjšim kot 2% imajo vrednost Hb 119,89 g/L, kar pomeni, da lahko še sami oz. s pomočjo zdravil, ki vsebujejo železo, vzdržujejo vrednost Hb nad 100 g/L in še ne potrebujejo terapije z eritropoetinom.

Iz grafa 4 je razvidno, da ima kontrolna skupina MCV (88,52 fL) v mejah referenčnih vrednosti (81-94 fL). Dializni bolniki imajo v povprečju makrocitne eritrocite (MCV 94,74 fL). Bolniki s kronično hemodializo izgubljajo večje količine folne kisline, in če je ne nadomeščamo v dovolj veliki količini, to vodi v razvoj makrocitnih megaloblastnih anemij. Povprečen MCV hematoloških bolnikov je 82,22 fL, kar je na spodnji meji normalnih vrednosti. Vzroki za nastanek manjših eritrocitov so lahko različni, odpoved kostnega mozga, levkemije, pomanjkanje železa, motnje v sintezi hema ali globina. Če je sinteza Hb motena, se celice eritroblastov večkrat delijo, z vsako delitvijo pa se velikost eritroblasta zmanjša. Tako nastanejo eritrociti, ki so manjši kot normalno.

Na grafih 11-13 so prikazane korelacije med RPI in retikulociti za posamezne skupine. Ugotovili smo, da je najboljša korelacija med RPI in retikulociti pri hematoloških bolnikih.

Vrednost Spearmanovega koeficienta je najvišja in blizu 1 (0,982), kar pomeni, da je ujemanje močno. Pozitiven Spearmanov koeficient kaže, da večji kot je RPI, večje je število novonastalih retikulocitov, iz česar sklepamo, da je tudi večja aktivnost kostnega mozga. Pri kontrolni skupini je korelacija pozitivna in močna ($R = 0,907$), medtem ko je pri dializnih bolnikih korelacija nekoliko slabša, vendar še vedno visoka ($R = 0,864$). Slabša je najverjetneje zato, ker je skupina dializnih bolnikov zelo heterogena. Nekateri bolniki so na terapiji z eritropoetinom in imajo zato večje vrednosti RPI v primerjavi s tistimi, ki še ne prejemajo eritropoetina. Iz tega lahko sklepamo, da je RPI dober pokazatelj aktivnosti kostnega mozga za skupino hematoloških bolnikov in kontrolno skupino, za dializne bolnike pa je nekoliko slabši pokazatelj, vendar še vedno dober.

Mogoče bi morali v raziskavo vključiti več različnih skupin, tudi tiste, za katere bi pričakovali povišano aktivnost kostnega mozga (hemolitične bolnike ali bolnike po obsežni krvavitvi), same skupine pa bi lahko bolj definirali npr. skupino dializnih bolnikov bi razdelili na tiste, ki prejemajo eritropoetin in tiste, ki ga ne. Prav gotovo bi bilo zanimivo nadaljevati s pričetno raziskavo.

6 SKLEP

RPI je izračunan parameter, ki korigira število retikulocitov glede na število eritrocitov. Korekcija je nujna, ker je delež retikulocitov lahko zavajajoč pri anemičnih pacientih. Anemični pacienti imajo lahko število eritrocitov zmanjšano, kar povzroči navidezno povečanje števila retikulocitov. Poleg tega RPI upošteva tudi nezrelost retikulocitov oz. podaljšan čas njihovega dozorevanja. Je uporaben parameter pri diagnozi anemije ter pri spremljanju odgovora kostnega mozga na terapijo. Ni direkten pokazatelj določene bolezni, nam pa pove, kakšne nadaljnje raziskave bodo potrebne pri ugotavljanju vzroka za anemijo.

Rezultati raziskave so pokazali:

- **RPI je dober pokazatelj aktivnosti kostnega mozga, ker je korelacija med RPI in številom retikulocitov močna v vseh treh skupinah, v hematološki, dializni in kontrolni skupini.**
- **korelacija med RPI in številom retikulocitov je pozitivna, kar pomeni, da večji kot je RPI, bolj aktiven je kostni mozeg**
- **korelacija je najboljša v skupini hematoloških bolnikov**
- **najmanjše ujemanje RPI in retikulocitov je v skupini dializnih bolnikov**
- **hematološki in dializni bolniki imajo znižan RPI, kontrolna skupina ima vrednosti RPI normalne**
- **RPI je močneje znižan pri mikrocitnih in makrocitnih anemijah kot pri normocitnih anemijah hematološke skupine**

Raziskovanja in iskanja novih poti za čim preprostejše preiskovanje in čim hitrejše postavljanje diagnoze so ključna za obolele ljudi. Pravzaprav je nujno izkoristiti boljše možnosti za dober izid zdravljenja. Menim, da bi tudi z RPI lahko pripomogli k poenostavitvi in pospešitvi diagnosticiranja, kar bi imelo za posledico utiranje poti pravočasni terapiji in tako povečani možnosti za ozdravitev.

7 LITERATURA

1. Andoljšek D. Bolezni krvi in krvotvornih organov. V: Interna medicina, Ljubljana. Kocijančič A., Mrevlje F. DZS, 1998: 1037-1078.
2. Turk H., Kersnik J.: Pristop k obravnavi anemij v ambulanti zdravnika družinske medicine. Medicinski razgledi (Suppl 1) 2007; 34.
3. Bresjanac M., Rupnik M.: Patofiziologija s temelji fiziologije, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2002: 15-18.
4. Ribarič S.: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije, 9.izd., Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2001: 180-194.
5. Pulko P., Rajšp P., Razpotnik M., Robač N., Soršak A., Stojnić D. Anemije, seminarska naloga
<http://www.mf.uni-mb.si/slike/Gradivo/Fiziologija07/Anemije.pdf>
(dostopano: september 2010)
6. Kumar P.J., Clark M. L.: Kumar&Clark's Clinical Medicine, 5th edition, London, 2002.
7. 9. srečanje internistov in zdravnikov splošne medicine »Iz prakse za prakso«, Zbornik predavanj in praktikum, Splošna bolnišnica Maribor, 1998.
8. Evropske smernice za zdravljenje anemije pri bolnikih s kronično ledvično odpovedjo (KLO), Ljubljana, Jansseen-Cilag, 2001.
9. Zbornik strokovnih prispevkov 8. podiplomskega seminarja zdravljenje s krvjo, Optimalno zdravljenje anemije v perioperativnem obdobju in varnost transfuzijskega zdravljenja, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, 2007.

10. Greer J.P., Wintrobe M.M. Wintrobe's Clinical Hematology. Volume 1. 12th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2009: 1-8.
11. Hillman R.S., Ault K.A., Rinder H.M.: Hematology in clinical practice: a guide to diagnosis and management. 4th edition. The McGraw Hill Companies 2005; 12-26.
12. Makrocitne anemije <http://www.medenosrce.net/pogled.asp?id=>
(dostopano september 2010)
13. Dopsaj V., Spasojević-Kalimanovska V., Marisavljevič D., Terzić B., Memon L.: Osnove laboratorijske dijagnostike i lečenja anemije, Beograd, 2006.
14. Vogrin B., Vogrin M., Miksić M., Roškar Z., Šauper M. Pomen določanja serumskih transferinskih receptorjev. Zdravstveni vestnik 2004; 73: 203-205.
15. Vaje iz klinične kemije: Hematologija
http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/KB/Gradivo/dnevnik_Hematologija.pdf
(dostopano: september 2010)
16. Hematologija
<http://www.cpi.si/files/cpi/userfiles/Zdravstvo,%20farmacija%20in%20kozmetika/Hematologija.pdf> (dostopano: september 2010)
17. Osnovne preiskave v hematologiji
http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/KB/Gradivo/4U%C5%A0farm_hematologija_gradivo_za_pripravo_na_vajo.pdf (dostopano: september 2010)
18. ADVIA 120 Technology
http://vetlabor.hu/images/laboratorium/advia120_ismerteto.ppt
(dostopano: november 2010)

19. Preložnik-Zupan I., Lenart K. Klinični pomen novih metod (količina hemoglobina v retikulocitih in hipokromni eritrociti) za oceno pomanjkanja železa v telesu. Zdravniški vestnik 2004; 73:499-502.
20. Giancomini A., Legovini P., Antico F., Gessoni G., Valverde S., Salvadego M. M., Manoni F. Evaluation of Platelet Analysis on the ADVIA 120 Hematology System. Laboratory Hematology 7. 2001: 180-185.
21. Advia 120 Hematološki analizator
<http://www.medcompare.com/details/13964/ADVIA-120-Hematology-System.html>
(dostopano: november 2010)
22. http://www.medical.siemens.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay~q_catalogId~e_-111~a_catTree~e_100001,1023065,1015820~a_langId~e_-111~a_productId~e_172953~a_storeId~e_10001~a_view~e_130.htm
(dostopano: november 2010)
23. Piva E., Brugnara C., Chiandetti L., Plebani M. Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. Clin Chem Lab Med 2010; 48 (10): 1369-1380.
24. Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease, National Kidney Foundation
http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_anemia/cpr12.htm
(dostopano: december 2010)
25. Reticulocyte count
<http://www.labtestsonline.org/understanding/analytes/reticulocyte/test.html>
(dostop: december 2010)
26. Chen H.B. Anemia of Chronic Disease: Making the right call. The Canadian Journal of CME. Avgust 2004.

27. Kessler C., Campbell P., Bolufe V., Fernandez I. Immature Reticulocyte Fraction and Reticulocyte Maturity Index.
<http://www.beckmancoulter.com/literature/ClinDiag/recticliterature.pdf>
(dostopano: januar 2011)

28. Perkins S. Diagnosis of Anemia
<http://www.ascp.org/pdf/SneekPeekPracDiagofHemDisorders.aspx>
(dostopano: januar 2011)

29. Reticulocytes and their significance
http://sysmex-europe.com/files/articles/Xtra_online_reticulocytes.pdf
(dostopano: januar 2011)