

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Helena Radochlibová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Autoimunitní hemolytické anémie

Bakalářská práce

University of Pardubice
Faculty of chemical technology

Autoimmune Haemolytic Anaemia
Bachelor thesis

2024

Helena Radochlibová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Helena Radochlibová**
Osobní číslo: **C21214**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Autoimunitní hemolytické anémie**
Téma práce anglicky: **Autoimmune Hemolytic Anemia**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis autoimunitních hemolytických anémií, a to především tzv. WAIHA = autoimunitních hemolytických anémií s tepelnými autoprotilátkami. V rámci zadaného tématu se nejprve obecně zaměřte na popis dělení hemolytických a autoimunitních anémií, jejich princip vzniku, výskyt, léčbu. Následně se zaměřte na detailní popis WAIHA, genetickou predispozici či další možnosti vzniku, jejich komplikace a léčbu.
2. Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *ScienceDirect*, *HighWire*, *NCBI Pubmed*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Autoimunitní hemolytické anémie jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2024

Helena Radochlibová v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Především bych chtěla poděkovat vedoucímu doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, PhD. za cenné rady, připomínky a trpělivost během zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během psaní bakalářské práce i v průběhu celého studia, kdy mi byli všichni velkou oporou.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá autoimunitními hemolytickými anémiemi, především se zaměřuje na autoimunitní hemolytickou anémii s tepelnými protilátkami (WAIHA). V úvodní části je popsána membrána erytrocytu, vznik a zánik erytrocytu, protilátky a antigeny. Následně se práce věnuje jednotlivým typům autoimunitních hemolytických anémií. Hlavní část práce zabývající se WAIHA popisuje její vznik, příznaky, diagnostiku a na závěr jsou shrnuty možnosti léčby.

KLÍČOVÁ SLOVA

anémie, imunita, protilátky, hemolýza, erytrocyty

TITLE

Autoimmune Haemolytic Anaemia

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the autoimmune haemolytic anaemias. The thesis focuses predominantly on description of warm autoimmune haemolytic anaemia (WAIHA). In the introduction part, the cell membrane, formation and destruction of red blood cells, including their antigens and corresponding antibodies is described. In addition, other types of autoimmune haemolytic anaemia are noted. The topical part of the thesis focuses on WAIHA including the description of their emergence, diagnostics and treatment.

KEYWORDS

anaemia, immunity, antibodies, haemolysis, erythrocytes

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK	11
ÚVOD.....	12
1. ERYTROCYT	13
1.1 Membrána erytrocytu.....	13
1.1.1 Proteiny v cytoplazmatické membráně erytrocytu.....	13
1.1.2 Lipidová dvojvrstva	16
1.2 Život erytrocytu.....	17
1.2.1 Erytropoéza	17
1.2.2 Zánik erytrocytu.....	18
2. PROTILÁTKY A ANTIGENY	19
2.1 Protilátky.....	19
2.2 Antigeny.....	21
3. AUTOIMUNITNÍ HEMOLYTICKÉ ANÉMIE.....	21
3.1 Autoimunitní onemocnění.....	21
3.2 Hemolytické anémie.....	22
3.2.1 Autoimunitní hemolytická anémie.....	23
3.2.1.1 Nemoc chladových aglutininů	23
3.2.1.2 Paroxysmální chladová hemoglobinurie	25
3.2.2 Evansův syndrom.....	26
3.2.3 Aloimunitní hemolytická anémie.....	28
3.2.4 Léky indukovaná hemolytická anémie	29
3.2.5 Infekcí zprostředkovaná hemolytická anémie.....	30

4.	AUTOIMUNITNÍ HEMOLYTICKÁ ANÉMIE S TEPELNÝMI PROTILÁTKAMI ..	30
4.1	Důvody vzniku onemocnění	30
4.2	Mechanismus hemolýzy	31
4.3	Příznaky onemocnění a diagnóza.....	33
4.4	Léčba	35
	POUŽITÁ LITERATURA	41

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 – Rozložení membránových proteinů erytrocytu.....	14
Obrázek 2 – Struktura glykoforinu	15
Obrázek 3 – Rh proteiny v membráně erytrocytu.....	16
Obrázek 4 – Erytropoéza	18
Obrázek 5 – Intravaskulární a extravaskulární hemolýza indukovaná protilátkami.	19
Obrázek 6 – Struktura protilátek.....	20
Obrázek 7 – Krevní nátěr pacienta s CAD	24
Obrázek 8 – Krevní nátěr pacienta s paroxysmální chladovou hemoglobinurií.....	26
Obrázek 9 – Krevní nátěr pacienta s Evansovým syndromem	27
Obrázek 10 – Hemolytické onemocnění novorozence	29
Obrázek 11 – Mechanismus vzniku protilátek namířeným proti erytrocytům.....	32
Obrázek 12 – Mechanismus hemolýzy u WAIHA.	33
Obrázek 13 – Přímý Coombsův přímý test.....	34
Obrázek 14 – Krevní nátěr u WAIHA	35
Obrázek 15 – Schéma léčby WAIHA	36
Obrázek 16 – Působení rituximabu na B-lymfocyty	38

SEZNAM TABULEK

Tabulka I – Nejvýznamnější proteiny v membráně erytrocytu a jejich funkce.....	13
Tabulka II – Autoimunitní hemolytické anémie, jejich četnost a typ figurujících protilátek....	22

SEZNAM ZKRATEK

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
AIHA	autoimunitní hemolytická anémie
APC	antigen prezentující buňka
ATP	adenosintrifosfát
BFU-E	jednotka tvořící shluky pro červenou krevní řadu
CAD	nemoc chladových aglutininů
CAIHA	chladová autoimunitní hemolytická anémie
CD	diferenční jednotka
CFU-E	jednotka tvořící kolonie pro červenou krevní řadu
ERY	erytrocyt
HIV	lidský virus imunitní nedostatečnosti
HSC	hematopoetická kmenová buňka
IgG/M/A/D/E	imunoglobulin typu G, M, A, D, E
IL	interleukin
LW	Lewis
lymf	lymfocyt
MAC	membránu atakující komplex
NK	přírozený zabiják
RhAG	glykoprotein asociovaný s Rh
RhD/C/c/E/e	Rh protein s antigeny D/C/c/E/e
TCC	terminální komplex komplementu
Tc-lymfocyt	cytotoxický T-lymfocyt
Th-lymfocyt	pomocný T-lymfocyt
WAIHA	autoimunitní hemolytická anémie s tepelnými protilátkami

ÚVOD

Anémie jsou nejčastějším neonkologickým onemocněním krve postihující téměř třetinu populace. Autoimunitní hemolytické anémie tvoří jen zlomek anémií. Tento typ anémií postihuje přibližně jednu tisícinu populace. Jde o anémie, které jsou způsobeny nadměrným rozpadem erytrocytů. Rozpad erytrocytů je zapříčiněn autoprotilátkami, jejichž produkce je patologická. Důvod tvorby těchto protilátek a jejich druh je odlišný dle konkrétního typu onemocnění. Díky autoimunitní povaze a nízké četnosti výskytu těchto onemocnění nejsou známy všechny mechanismy a příčiny jejich vzniku. Aktuální léčebné postupy pro tento druh anémií zahrnují podávání kortikosteroidů, monoklonálních protilátek a imunosupresiv, v některých případech také provedení splenektomie. Nezbytná je podpůrná léčba prostřednictvím suplementace vitamínů, prevence vzniku trombózy a infekce.

Cílem této práce je popis autoimunitních hemolytických anémií, jejich četnosti, vzniku, příznaků a aktuální léčby. Největší pozornost je v práci věnována autoimunitní hemolytické anémii s tepelnými protilátkami.

1. Erytrocyt

1.1 Membrána erytrocytu

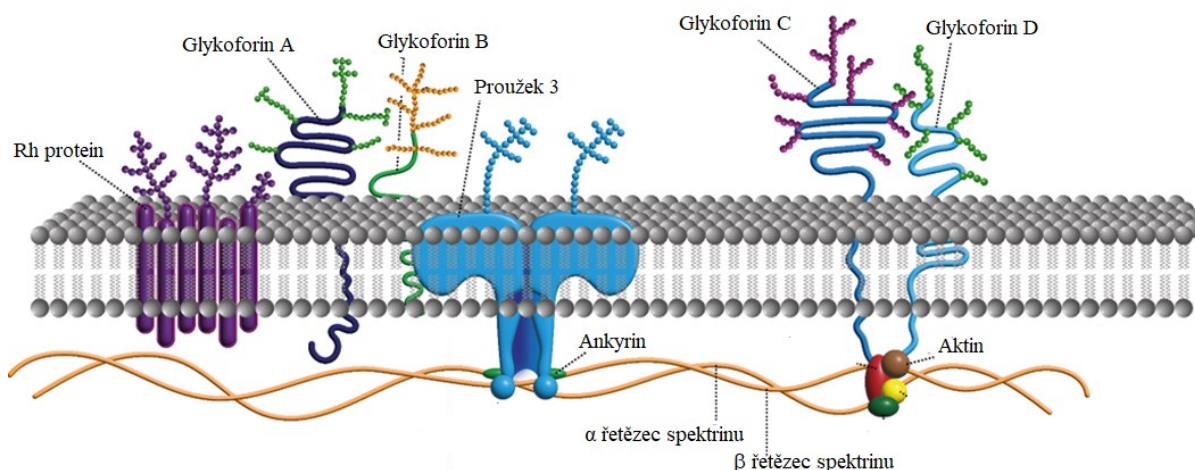
Během své cesty cévami prochází erytrocyt velkým množstvím deformací, nutnou flexibilitu poskytuje zejména jeho cytoplazmatická membrána. Ta obsahuje 20 hlavních proteinů (např. aktin, ankyrin, glykoforiny, proužek 3, Rh komplex a spektriny) (tab. I) a asi 850 proteinů vedlejších (Lykotrafitis et al, 2014). Syntéza proteinů membrány je velmi důležitá součást diferenciacce erytroidních buněk a je to jeden z prvních kroků při vývoji erytrocytu v kostní dřeni (Andolfo et al, 2016).

Tabulka I – Nejvýznamnější proteiny v membráně erytrocytu a jejich funkce

Proteiny v membráně erytrocytu	Funkce
aktin	molekulární spojení skeletu
ankyrin	propojení spektrinu a proužku 3
proužek 3	místo pro připojení enzymů a deoxyhemoglobinu, kanál pro výměnu iontů
spektrin	ohybnost a deformabilita membrány
glykoforiny	kanál pro výměnu iontů
Rh komplex	detoxikace látek v buňkách

1.1.1 Proteiny v cytoplazmatické membráně erytrocytu

Hlavním proteinem membrány erytrocytu je proužek 3 (obr. 1) (oficiálně SLC4A1). Funkčně se však jedná o dva proteiny, které se formují do tetramerů. Prvním proteinem je N-terminální cytoplazmatický periferní protein, který je klíčovým místem pro připojení glykolytických enzymů a deoxyhemoglobinu (Kuter, 2022). Druhým proteinem je C-terminální integrální membránový protein, který tvoří kanál pro výměnu aniontů a napomáhá s výměnou oxidu uhličitého (Lux, 2016).

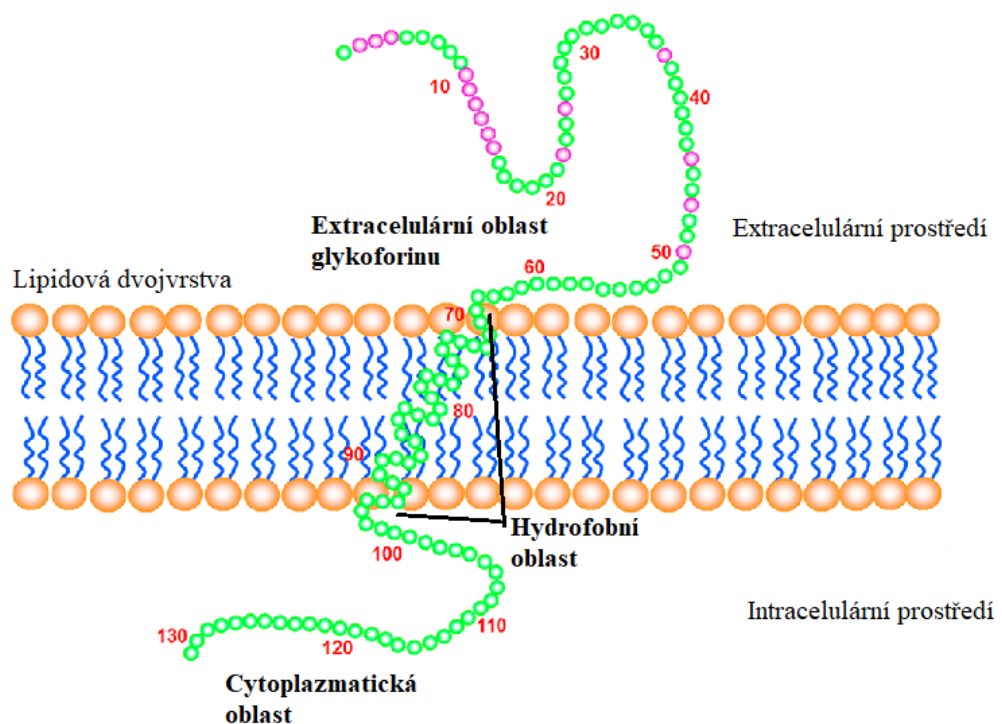


Obrázek 1 – Rozložení membránových proteinů erythrocytu (upraveno dle Kutera, 2022).

K proužku 3 je prostřednictvím ankyrinu připojen spektrin (obr. 1). Ankyrin je otevřená spirálová struktura, která je složena ze tří opakujících se úseků. V každém vlákně spektrinu se opakuje několik úseků s vazebnými místy, na šest vazebných míst spektrinu se váže jeden ankyrin. Zároveň se na šest spektrinových vazebných míst váže jeden aktin, což vede k pseudohexagonálnímu uspořádání skeletu membrány. Spektrin je složen ze dvou dlouhých ohebných proteinových vláken α a β spektrinu. Tato vlákna jsou k sobě paralelní a orientovaná v opačném směru. Izolované řetězce spektrinu se k sobě váží elektrostaticky, po spojení se sepnou a zatočí se kolem sebe. Interakce mezi vlákny jsou slabé, což jim umožňuje se mírně odpojovat a klouzat kolem sebe, když se membrána ohýbá, smršťuje, či roztahuje. Některé z úseků spektrinu jsou nestabilní i za fyziologických teplot. Toto vede k ojedinělému mírnému rozplétání svinutých řetězců, což přispívá k deformovatelnosti membrány. Membrána erythrocytu obsahuje také krátká dvoušroubovicová vlákna nesvalového β aktinu (obr. 1), která slouží jako molekulární spojení ve skeletu membrány. Vlákna aktinu jsou uložena rovnoběžně s rovinou membrány a jejich vzájemná orientace je náhodná (Lux, 2016).

Glykoforiny (obr. 1) jsou významným vazebným místem pro protilátky při hemolytických anemiích. Jde o transmembránové glykoproteiny, které poskytují kanál pro výměnu Cl^- a HCO_3^- iontů. Glykoforiny tvoří 2 % všech membránových proteinů erythrocytu (De Oliveira et al, 2010). Molekuly glykoforinů mají tři specifické oblasti: hydrofobní oblast, cytoplazmatickou oblast a extracelulární oblast. Hydrofobní oblast překlenuje lipidovou dvojvrstvou, cytoplazmatická oblast obsahuje shluky bazických zbytků a nachází se těsně pod

povrchem cytoplazmatické membrány. Extracelulární oblast vyčnívá nad cytoplazmatickou membránu (obr. 2). Existují čtyři typy glykoforinů v membráně erythrocytu. Glykoforiny A a B se vyskytují v hojnějším zastoupení a nesou antigeny pro krevní skupiny typu MNsSU (Lux, 2016). Glykoforin A je nejčastější, tvoří 80 % glykoforinů. Obsahuje zbytky kyseliny sialové, čímž zapříčiňuje většinu negativního náboje erythrocytu. Tento záporný náboj je zásadní pro interakce mezi dvěma erythrocyty, mezi erythrocytem a vaskulárním endotelem a mezi erythrocytem a dalšími krevními elementy (De Oliveira et al, 2010). Glykoforiny C a D jsou na membráně zastoupeny méně často. Nesou antigeny pro Gerbichovy krevní skupiny a interakcemi s dalšími membránovými proteiny váží aktinový junkční komplex s membránou (Lux, 2016).

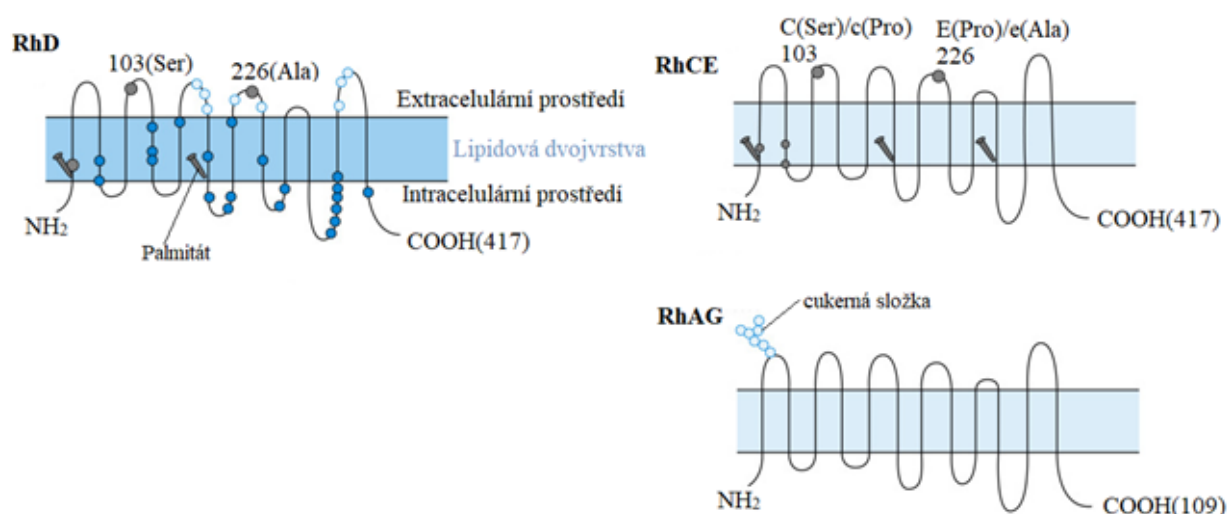


Obrázek 2 – **Struktura glykoforinu** (upraveno dle Xia et al, 2013).

Své místo na membráně erythrocytu mají i Rh proteiny RhD, nebo RhCcEe. Tyto proteiny jsou kódovány geny RHD, nebo RHCE lokalizovanými na krátkém raménku chromozomu 1 (Westhoff, 2007). Rh proteiny jsou polypeptidové řetězce o 417 aminokyselinách. Řetězce membránou erythrocytu prochází 12krát, na vnější straně membrány tvoří 6 smyček, na kterých se nacházejí vlastní antigeny (obr. 3). Dva stejné Rh proteiny se spojují v Rh komplex spolu se dvěma řetězci RhAG (glykoprotein asociovaný s Rh),

k tomuto tetrameru bývají nekovalentními vazbami připojeny další membránové struktury, nejčastěji glykoforin B, nebo LW glykoprotein (Lewis) (Avent et al, 2000).

Rh komplex je nejvíce imunogenní struktura na membráně erytrocytu a tvoří nevíce polymorfní systém krevních skupin. Rh komplex se podílí na udržování mechanických vlastností erytrocytu díky interakcím se spektrinovou kostrou prostřednictvím ankyrinu. Další funkcí Rh komplexu je účast na detoxikaci látek v buňkách, protože struktura RhAG poskytuje kanál pro výměnu NH_4^+ a H^+ (Kim et al, 2006).



Obrázek 3 – Rh proteiny v membráně erytrocytu (Ala – alanin, Pro – prolin, Ser – serin, RhAG – glykoprotein asociovaný s Rh, RhCE – Rh protein s antigeny C a E, RhD – Rh protein s antigenem D), (upraveno dle Shaz, 2009).

1.1.2 Lipidová dvojvrstva

Lipidová dvojvrstva působí jako bariéra pro zadržování iontů a molekul uvnitř erytrocytu. Molekuly a ionty mohou membránou procházet pomocí transmembránových proteinů (Mohandas et al, 2008). Mezi erytrocytem a okolní plazmou existuje kationtový gradient s vysokým podílem K^+ v buňce. Unikající draselné ionty jsou pumpovány zpět do buňky pomocí sodnodraselné pumpy výměnou za sodné ionty za spotřeby ATP (Andolfo et al, 2016).

Lipidová dvojvrstva je tvořena ekvivalentním množstvím cholesterolu a fosfolipidů. Cholesterol je v membráně uložen rovnoměrně, ale fosfolipidy jsou distribuovány asymetricky (Mohandas et al, 2008). Vnější část membrány hraničící s extracelulárním prostorem a je tvořena cholinovými fosfolipidy, fosfatidylcholinem a sfingomyelinem. Vnitřní část membrány

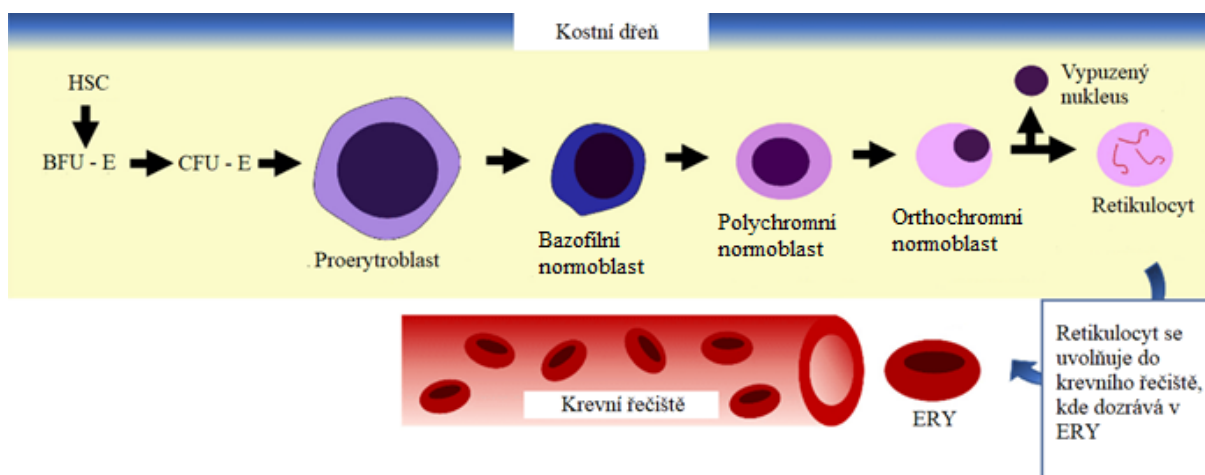
hraničící s cytozolem obsahuje především aminofosfolipidy, fosfatidylethanolamin a fosfatidylserin. Asymetrické rozložení fosfolipidů je zajištěno specifickými enzymy, ATP dependentní translokázou a Ca^{2+} dependentní skramblázou. Ztráta asymetrického rozložení fosfolipidů vede k narušení membrány a odstranění erytrocytu z oběhu (Stevens-Hernandez et al, 2022).

1.2 Život erytrocytu

1.2.1 Erytropoéza

Zralý erytrocyt je bezjaderný krevní element bikonkávního tvaru, jehož hlavní funkcí je transport krevních plynů tělem. Erytropoéza je složitý vícestupňový proces vývoje erytrocytu od základní hematopoetické kmenové buňky (HSC) až po zralý erytrocyt. U plodu probíhá ve žloutkovém vaku, slezině a fetálních játrech. Během 20. týdne vývoje plodu se erytropoéza přesouvá do kostní dřeně, kde HSC zůstávají a poskytují zdroj erytropoézy pro postnatální život (Dzierzak et al, 2013).

Erytropoéza je regulována zejména erythropoetinem, což je humorální cytokin, který se do krevního oběhu dostává z ledvin, ve kterých je syntetizován. V krvi erythropoetin cílí na HSC, na kterých se váže na erythropoetinové receptory. Navázáním erythropoetinu na receptory se spouští kaskáda aktivačních reakcí a zároveň dojde k zániku molekuly erythropoetinu i receptoru (Život et al, 2017). Interakcí HSC a dalších růstových faktorů vznikne struktura označovaná jako BFU-E (jednotka tvořící shluky pro červenou krevní řadu). Na BFU-E působí opět erythropoetin a rychlým dělením a diferenciací vzniká struktura CFU-E (jednotka tvořící kolonie pro červenou krevní řadu). Dalším vznikajícím stádiem je proerytroblast, který se po dobu 2–3 dnů zmenšuje a jeho jaderný chromatin se kondenzuje. Ve stádiu proerytroblastu začíná syntéza hemoglobinu. Intenzita syntézy hemoglobinu a jeho akumulace postupně roste ve stádiích bazofilního, polychromního a orthochromního normoblastu. Ve stádiu bazofilního normoblastu začíná syntéza membránových proteinů, a to především spektrinu, ankyrinu a proužku 3. Ve stádiu orthochromního normoblastu dochází k finální fázi diferenciaci, k enukleaci. Toto vypuzené jádro je následně fagocytováno makrofágy. Vzniklá struktura se nazývá retikulocyt, má kulatý tvar a stále obsahuje zbytky organel, jejichž součástí byla RNA. Retikulocyt se uvolňuje do krevního oběhu, kde během 24 hodin dochází k úplnému dozrání v erytrocyt (obr. 4) (Stevens – Hernandez et al, 2022).

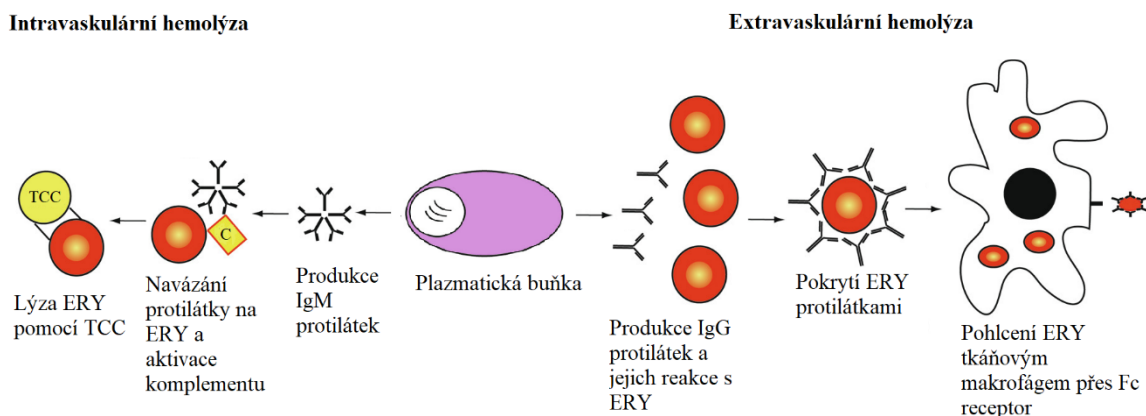


Obrázek 4 – **Erytropoéza** (HSC – hematopoetická kmenová buňka, BFU-E – jednotka tvořící shluky pro červenou krevní řadu, CFU-E – jednotka tvořící kolonie pro červenou krevní řadu, ERY – erytrocyt), (upraveno dle Stevens – Hernandez et al, 2022).

1.2.2 Zánik erytrocytu

Erytrocyt přežívá v krevním oběhu průměrně 120 dní a poté podléhá destrukci. První typ zániku je intravaskulární hemolýza, kdy se erytrocyt rozpadá v cévách. Rozpad může být způsoben přímo erytrocytem (= korpuskulární hemolýza). Během života na erytrocyt působí oxidační stres, což poškozuje membránu. Tyto stárnoucí erytrocyty určené k destrukci jsou označovány protilátkami pro vychytávání makrofágy. Další příčina rozpadu je v okolí erytrocytu (= extrakorpuskulární hemolýza). Okolní vlivy způsobující hemolýzu mohou být imunitní, kdy se IgM protilátka, nebo méně často dvě IgG protilátky, naváží na erytrocyt a aktivují klasickou dráhu komplementu. Destrukce erytrocytu je tedy zprostředkována pomocí terminálního komplexu komplementu (obr. 5). Může docházet i k nepřímé imunitně zprostředkované destrukci erytrocytu, kdy je erytrocyt opsonizován meziprodukty komplementové kaskády a poté je fagocytován makrofágy (Thiagarajan et al, 2021). Hemolýza způsobená vnějšími vlivy může být také neimunitní povahy, kdy na membránu působí toxiny nebo dochází k mechanickému poškození (Keohane et al, 2016).

Dalším typem zániku erytrocytu je extravaskulární hemolýza. Erytrocyt je mimo cévu opsonizován IgG protilátkami, čímž je označen pro likvidaci tkáňovým makrofágem. Makrofág poté erytrocyt velmi účinně fagocytuje přes Fc receptor (obr. 5). Uvolněný hemoglobin z rozpadlého erytrocytu i jeho zbytky jsou fagocytovány tkáňovými makrofágy a vznikající bilirubin je uvolněný do okolní tkáně (Beutler, 2001).



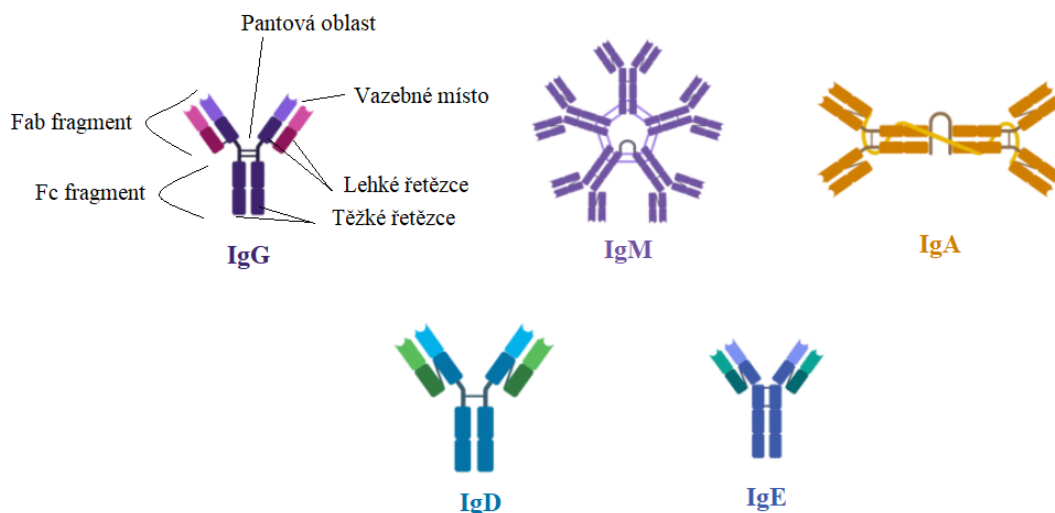
Obrázek 5 – **Intravaskulární a extravaskulární hemolýza indukovaná protilátkami** (ERY – erytrocyt, TCC – terminální komplex komplementu, C – komplement), (upraveno dle Siddona et al, 2019).

2. Protilátky a antigeny

2.1 Protilátky

Protilátky jsou molekuly bílkovinné povahy, které tvoří 20 % všech bílkovin v plazmě. Jsou produkovány B-lymfocyty. Antigen reaguje s receptory na B-lymfocytech, čímž jsou aktivovány transkripční faktory. Transkripční faktory spustí diferenciaci B-lymfocytu na plazmatickou buňku, která produkuje protilátky. Tyto nově vzniklé protilátky jsou vysoce specifické pro antigen, který spustil signál pro jejich tvorbu (Schroeder et al, 2010). Po odeznění imunitní reakce dojde k přeměně části plazmatických buněk v paměťové buňky. Tyto paměťové buňky mají schopnost zrychleně tvořit protilátky při opakovaném vystavení antigenu (Vaillant et al, 2023).

Základní strukturou protilátky jsou dva páry polypeptidových řetězců, dvou lehkých a dvou těžkých řetězců. Řetězce jsou spojeny disulfidickými vazbami (obr. 6). Protilátku lze v pantové oblasti rozštěpit na tři části. První dvě části tvoří rozvětvená ramena, která jsou složena z části těžkého řetězce a celého lehkého řetězce. Tato ramena jsou označována jako Fab fragmenty. Fab fragment je variabilní a na jeho koncích se nachází vazebné místo pro antigen. Třetí část protilátky je tvořena zbytky obou těžkých řetězců. Tato část je označována jako Fc fragment a je konstantní. Protilátky lze rozřadit do pěti základních skupin IgG, IgM, IgA, IgD a IgE (imunoglobulin typu G, M, A, D, E) (obr. 6), jejichž celková koncentrace v séru je asi 15 g/l (Gerpe, 2021).



Obrázek 6 – **Struktura protilátek**, (upraveno dle Gerpe, 2021).

IgG protilátky se vyskytují pouze ve formě monomerů, mají tedy velmi nízkou molekulovou hmotnost. Jejich koncentrace v séru je přibližně 10 g/l. Jsou tvořeny převážně během sekundární imunitní odpovědi a aktivují klasickou dráhu komplementu (Vaillant et al, 2023). Protilátky typu IgG se váží na specifické receptory na povrchu placenty, kterou prochází a chrání plod před infekčními chorobami, proto jde o nejhojnější protilátky v krvi novorozence. Rozdělují se do čtyř podskupin, z nichž nejvýznamnější svou vazebnou silou je typ IgG1. Typ IgG2 má zvláštní schopnost obrany proti opouzdřeným bakteriím, které jsou imunitním systémem těžko rozpoznatelné. Typy IgG3 a IgG4 se podílejí na ochraně před virovými infekcemi (Gerpe, 2021).

IgM protilátky jsou formovány do struktury pentamerů, jde o protilátky s největší vazebnou silou (představují například protilátky proti krevním skupinám). Jejich koncentrace v séru je přibližně 1,5 g/l. Vzhledem k pentamerové struktuře mají vysokou molekulovou hmotnost, nedokáží tedy opouštět krevní řečiště a působí pouze intravaskulárně. Tvoří se především během primární imunitní odpovědi a aktivují klasickou dráhu komplementu. Zároveň se monomery IgM protilátek vyskytují jako receptory na B-lymfocytech (Vaillant et al, 2023).

Protilátky třídy IgA se v těle vyskytují ve dvou variantách, jako monomer se vyskytují v séru, kde je koncentrace asi 3 g/l (Vaillant et al, 2023). IgA chrání epiteliální povrchy respiračního, trávicího a urogenitálního systému, pro tyto účely je IgA ve formě dimeru s připojenou sekreční komponentou. IgA protilátky se hojně vyskytují v mateřském mléce a poskytují pasivní imunitní ochranu novorozence (Woof et al, 2006).

2.2 Antigeny

Antigeny jsou struktury na povrchu buněk, které jsou schopné vyvolat imunitní odpověď. Nacházejí se na povrchu cizorodých buněk a vyvolávají reakci vedoucí k destrukci cizorodé buňky. Antigeny jsou i na povrchu vlastních buněk a za normálních okolností nijak nereagují. Antigenem může být například molekula glykolipidu, nebo glykoproteinu, u nichž za antigenní specifitu odpovídá cukerná složka. Antigeny mohou být také lipoproteinové povahy, u nichž za specifitu zodpovídá bílkovinná část (Dean, 2005).

Na povrchu erytrocytů jsou antigeny zodpovědné za rozlišování krevních skupin. Je známo přibližně 250 antigenů krevních skupin, které jsou rozřazeny do 23 systémů (například AB0, Rh, Kidd, Duffy). Stále se však objevují antigeny krevních skupin čekající na zařazení do systému. Znalost antigenní specifity erytrocytů je významná především pro předejití potransfuzním reakcím (Pourazar, 2007).

3. Autoimunitní hemolytické anémie

3.1 Autoimunitní onemocnění

Autoimunitní onemocnění jsou rozmanitou škálou stavů způsobených poruchou imunitního systému, jež způsobuje reaktivitu vůči vlastním antigenům. Autoimunitní onemocnění jsou způsobena aberantní reaktivitou T a B-lymfocytů vyvolanou kombinací genetické predispozice a faktoru prostředí. Autoimunitní onemocnění postihují osoby jakéhokoliv věku s větší četností u žen. Projevy těchto onemocnění jsou různé a zahrnují akutní, život ohrožující stavy, i bezpříznakové drobné laboratorní odchylky (Piesetsky, 2023). Lze je rozdělit na orgánově specifická onemocnění, kdy jsou autoprotilátky namířeny proti konkrétnímu orgánu (např. štítná žláza u Hashimotovy tyreoiditidy) a orgánově nespecifické, kdy jsou autoprotilátky namířeny proti antigenům roztroušeným po organismu (např. jaderné antigeny u lupusu) (Fairweather, 2007). U autoimunitních onemocnění se obvykle objevují stejné znaky: přítomnost autoprotilátek, zánětlivé reakce, mononukleárních fagocytů, autoreaktivních T-lymfocytů a zvýšené množství plazmatických buněk (Piesetsky, 2023).

Poškození tkání je zprostředkováno několika mechanismy. Nejčastěji se autoprotilátky naváží na buňku nebo tkáň dle své specifity, a spustí klasickou dráhu komplementu, nebo fagocytózu. Další mechanismus poškozování tkání nastává, pokud autoprotilátky reagují s receptory na povrchu cílové struktury a mění jejich funkci (například autoprotilátky proti tyreotropinovému receptoru blokuje stimulaci štítné žlázy, což má za následek vznik Gravesovy

choroby) (Fairweather, 2007). Při některých onemocněních dochází ke vzniku imunokomplexů. Imunokomplexy se hromadí v ledvinách a aktivují klasickou dráhu komplementu. Některá onemocnění jsou zprostředkována buněčně prostřednictvím T-lymfocytů. Antigen specifické CD4⁺ (diferenciační jednotka) pomocné T-lymfocyty (Th-lymfocyty) stimulují produkci autoprotilátek a cytotoxické CD8⁺ T-lymfocyty (Tc-lymfocyty) přímo poškozují, nebo usmrcují cílové buňky (Piesetsky, 2023).

3.2 Hemolytické anémie

O diagnózu anémie jde, pokud množství hemoglobinu v krvi klesne pod 130 g/l u mužů a 120 g/l u žen (fyziologické hodnoty: muži 135–175 g/l, ženy 120–160 g/l), nebo pokud hlesne hematokrit pod 39 % u mužů a pod 35 % u žen (fyziologické hodnoty: muži 44±5 %, ženy 35±4 %). Hemolytické anémie vznikají zvýšeným rozpadem erytrocytů z různých příčin. Typickým nálezem pro tyto anémie je zvýšení koncentrace nekonjugovaného bilirubinu v séru, aktivovaná červená krevní řada v kostní dřeni a retikulocytóza v krevním obrazu (Dhaliwal et al, 2004). V případě autoimunitních hemolytických anémií je hemolýza zprostředkována autoprotilátkami namířenými proti povrchovým antigenům na erytrocytech. Autoimunitní hemolytické anémie jsou skupinou vzácných onemocnění, u nichž patologicky působí různé typy autoprotilátek (tab. II) (Hoffman, 2009).

Tabulka II – Autoimunitní hemolytické anémie, jejich četnost a typ figurujících protilátek (WAIHA-autoimunitní hemolytická anémie s tepelnými protilátkami, CAIHA – autoimunitní hemolytická anémie s chladovými protilátkami, CAD – nemoc chladových aglutininů, IgG/A/M – imunoglobulin typu G/A/M)

Druh autoimunitní hemolytické anémie	Četnost onemocnění na 100000 osob	Typ protilátky způsobující hemolýzu
WAIHA	1-3	IgG, IgM
CAIHA	0,3	IgG, IgA, IgM
CAD	1	IgG, IgA
Paroxysmální chladová hemoglobinurie	0,04	IgG
Evansův syndrom	0,18	IgG
Hemolytické onemocnění novorozence	3–80	IgG
Léky indukovaná anémie	0,1	IgG
Infekcí indukovaná anémie	-	IgM, IgG

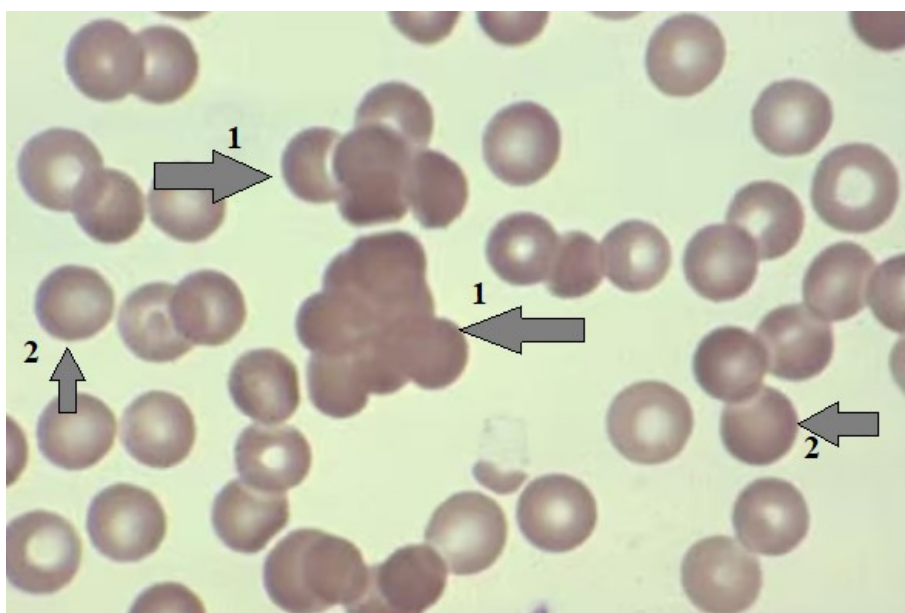
3.2.1 Autoimunitní hemolytická anémie

Nejvýznamnější onemocnění v této práci je autoimunitní hemolytická anémie (AIHA) to je soubor onemocnění způsobené protilátkami namířenými proti erytrocytům. Tyto protilátky jsou dále děleny dle specifické teploty, při které jsou schopné se navázat na antigen. Autoimunitní hemolytická anémie s tepelnými autoprottilátkami (WAIHA) je nejčastějším typem AIHA, jde asi o 48–70 % všech případů. Účinkující protilátky jsou aktivní při teplotách 37–40 °C (Kuter, 2022). Jde o poměrně vzácné onemocnění, jehož četnost je 1–3:100000, úmrtnost je asi 10 %. Ženy jsou tímto onemocněním ohroženy dvakrát častěji než muži. Onemocnění se může projevit v jakémkoli věku, ale nejčastěji postihuje osoby ve věku 50-70 let, u dětí je zvýšená četnost onemocnění okolo 4. roku života (Gehrs et al, 2002).

Méně častá je chladová autoimunitní hemolytická anémie (CAIHA). Tento typ pokrývá asi 16–32 % případů AIHA. Chladové protilátky jsou aktivní při teplotách 0-4 °C a při fyziologických teplotách lidského organismu nemají tyto protilátky k erytrocytům téměř žádnou afinitu (Gehrs et al, 2002). V 90 % případů je hemolýza zprostředkována protilátkami typu IgM, v menším množství se mnohou objevit autoimunitně aktivní IgG, nebo IgA (Bass et al, 2014). Chladové protilátky se dočasně váží k erytrocytům a aktivují komplement. Na erytrocyty se váže protein komplementové kaskády faktor C3, což označí erytrocyty pro fagocytózu makrofágy v játrech. Zřídka je destrukce erytrocytu způsobena terminálním komplexem komplementu (TCC). Tento typ AIHA postihuje zpravidla častěji ženy než muže starší 70 let. Pouze ojediněle mohou pacienti trpět oběma typy AIHA zároveň (Gehrs et al, 2002). CAIHA bývá častěji chronická než akutní a při běžné prohlídce pacienta není zřetelná. Pouze 20 % případů doprovází splenomegalie. Pokud se však objeví závažnější forma, doprovází ji příznaky jako je horečka, bledost, ikterus, hepatosplenomegalie, tachykardie, angina pectoris, nebo srdeční selhání (Bass et al, 2014).

3.2.1.1 Nemoc chladových aglutininů

Zvláštní formou CAIHA je nemoc chladových aglutininů (CAD), při tomto onemocnění se klonální lymfoproliferativní onemocnění kostní dřeně projevuje jako AIHA. Hemolýza je způsobena TCC, nebo jsou erytrocyty fagocytovány po opsonizaci meziproduktem komplementu C3b. Protilátky způsobující hemolýzu jsou chladové jejichž teplotní optimum je 3-4 °C. Obvykle jde o kombinaci monoklonálních protilátek typu IgG a IgA. Onemocnění je vzácné, s četností 1:100000 a postihuje výhradně dospělé bez pohlavní prevalence (Gabbard et al, 2020). V krevním nátěru se obvykle objevují sférocyty a aglutinační shluky, mohou se objevovat také retikulocyty a polychromatické erytrocyty (obr. 7) (Collie et al, 2023).



Obrázek 7 – Krevní nátěr pacienta s CAD (1 – aglutinační shluky, 2 – sférocyty), zvětšení 100x, (Collie et al, 2023).

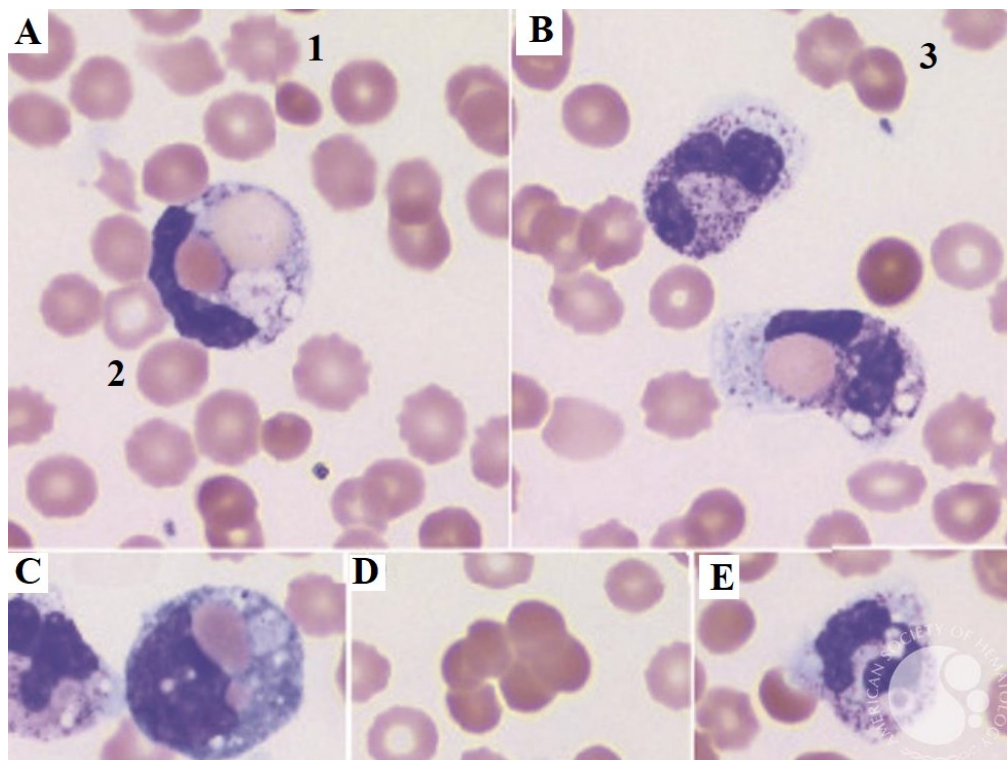
Nejvýznamnějším léčebným postupem je podávání transfúze erytrocytů a plazmaferéza. Při léčbě má velký význam udržování pacienta v teple, a to především končetiny a obličej. Splenektomie je účinná u CAD zprostředkovaným pouze IgG protilátkami. Léčba steroidy se k léčbě CAD nepoužívá, jelikož na jejich podávání reaguje pouze 14 % pacientů a u většiny z nich je nutné dlouhodobé podávání nepřijatelně vysokých dávek k udržení remise (Berentsen, 2016). Pro léčbu CAD jsou používána léčiva rituximab a fludarabin, jejichž účinnost je 76 % (monoléčba rituximabem má úspěšnost 50 %), avšak při jejich užívání se objevuje množství vedlejších účinků (Gabbard et al, 2020). Z tohoto důvodu se stále pracuje na vývoji léčiv, jde především o léčiva blokující komplementovou kaskádu. Využívají se například anti-C5, nebo anti-C1 monoklonální protilátky. Po podání obou těchto protilátek došlo u pacientů k výraznému zvýšení množství hemoglobinu a snížení množství použitých transfúzí (Berentsen et al, 2020).

3.2.1.2 Paroxysmální chladová hemoglobinurie

Jde o komplementem zprostředkované onemocnění, které se projevuje jako CAIHA, jde o jeho nejvzácnější variantu s četností 0,04:100000 (Shanbhag et al, 2015). Nejčastěji postihuje děti do pěti let věku s hematologickými malignitami (chronická lymfatická leukémie, myelodysplastický syndrom), nebo infekcemi (*Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*). Může postihovat i dospělé trpící terciálním stádiem syfilis. Paroxysmální chladová hemoglobinurie se vyskytuje s větší četností u mužů (Jacobs et al, 2023).

Účinkující polyklonální IgG protilátky jsou namířeny proti polysacharidovému antigenu na povrchu erytrocytu. Jsou aktivní při snížené teplotě, kdy se naváží na erytrocyt a aktivují komplementovou kaskádu. K hemolýze dochází, pouze pokud po aktivaci komplementu dojde ke zvýšení teploty a protilátka se odpoutá od erytrocytu. Tím je dokončena aktivace komplementu a dochází k lýze a uvolnění hemoglobinu (Slemp et al, 2014). Onemocnění se projevuje rychlým nástupem akutní hemolýzy. Po podání transfúze erytrocytů a udržování pacienta v teple dochází k velmi rychlému zotavení. V případě neustávajících příznaků je možné započít steroidovou léčbu (Shanbhag et al, 2015).

V krevním nátěru se objevuje zvýšené množství neutrofilů s patologickou granulací a vakuolizací. Často se vyskytuje fagocytóza erytrocytů neutrofily a občasně monocyty. Objevují se také aglutinační shluky a fagocytóza trombocytů neutrofily. Erytrocyty bývají patologické, nejčastěji jde o schistocyty a sférocyty (obr. 8) (Li et al, 2016).

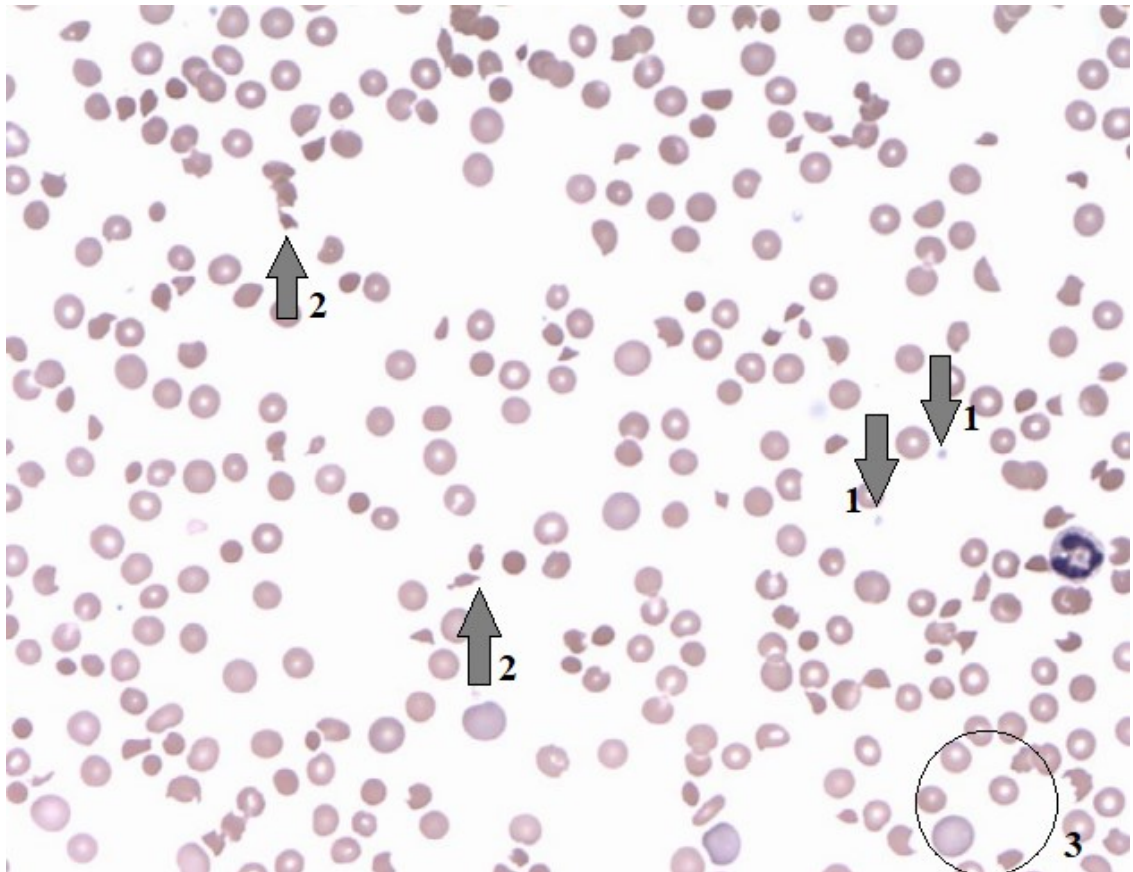


Obrázek 8 – Krevní nátěr pacienta s paroxysmální chladovou hemoglobinurií (A–B: zvýšené množství neutrofilů s patologickou granulací a vakuolizací, fagocytóza erytrocytů neutrofilů, 1 – schistocyty, 2 – sférocyty, 3 – polychromatické erytrocyty, C: fagocytóza erytrocytů monocyty, D: aglutinace erytrocytů, E: fagocytóza trombocytů neutrofilů), zvětšení 1000x, (upraveno dle Li et al, 2016).

3.2.2 Evansův syndrom

Jde o stav, kdy se zároveň, nebo samostatně, projevuje imunitní trombocytopenie a AIHA. V 15 % případů je stav doprovázen také imunitní neutropenií. Toto onemocnění je vzácné, jeho četnost je 0,18:100000 a postihuje především děti do 13 let. Evansův syndrom se dělí na primární a sekundární formu podle příčin jeho vzniku, četnost těchto forem je 1:1 (Audia et al, 2020). Příčiny vzniku primárního Evansova syndromu nejsou zcela jasné, předpokládá se však genetická predispozice. U 40 % pacientů s Evansovým syndromem se objevuje mutace na některém z genů podílejících se na imunodeficienci. U 25 % pacientů se objevila mutace na jiných genech, které nemají přímé spojení s autoimunitními chorobami a u 35 % se neobjevuje mutace na žádném genu. K diagnóze primární formy onemocnění dochází vyloučením ostatních příčin (Hadjadj et al, 2019). Sekundární Evansův syndrom doprovází zpravidla tato onemocnění: autoimunitní lymfoproliferativní syndrom, systémový lupus erythematoses, autoimunitní hepatitida, hepatitida typu C, nebo tuberkulóza (Pérez et al, 2018).

Diagnóza je charakteristická sníženým počtem krevních elementů – trombocytů, erytrocytů a případně i neutrofilů. Mohou se objevovat patologické erytrocyty, a to schistocyty a polychromatické erytrocyty (obr. 9). Nemoc se projevuje také zvýšeným množstvím bilirubinu a laktátdehydrogenázy v séru. Stěžejní pro diagnostiku je však přímý a nepřímý Coombsův test, který potvrdí přítomnost protilátek proti antigenům na erytrocytech, trombocytech, nebo i neutrofilech (Kalfa, 2016).



Obrázek 9 – **Krevní nátěr pacienta s Evansovým syndromem** (1 – trombocyty, jejichž množství je sníženo, 2 – schistocyty, 3 – polychromatické erytrocyty, celkové množství erytrocytů je sníženo), zvětšení 100x, (Bhatnagara et al, 2020).

Léčbou je především podávání kortikosteroidů (nejčastěji prednisonu), protože mají schopnost inhibovat vychytávání erytrocytů a trombocytů makrofágy. U chronických případů se z kortikosteroidů přechází k podávání monoklonální protilátky rituximabu. Léčivem, které prokázalo účinek pro léčbu Evansova syndromu, avšak ještě není běžně používáno, je ester kyseliny mykofenolové. To je imunosupresivum snižující proliferaci lymfocytů (Audia et al, 2020). Ve velmi vážných případech je možné využití transfúze erytrocytů, nebo trombocytů. Splenektomie je obvykle prováděna pouze u chronických pacientů v těžkém stavu, avšak účinek u pacientů je různý. Navíc provedení splenektomie je zatíženo rizikem infekce,

trombózy, nebo krvácení. Splenektomie není doporučována u pacientů se sekundárním Evansovým syndromem, pokud je primárním onemocněním autoimunitní lymfoproliferativní syndrom, protože u těchto pacientů je zvýšené riziko sepse a multilineární cytopenie (Pérez et al, 2018).

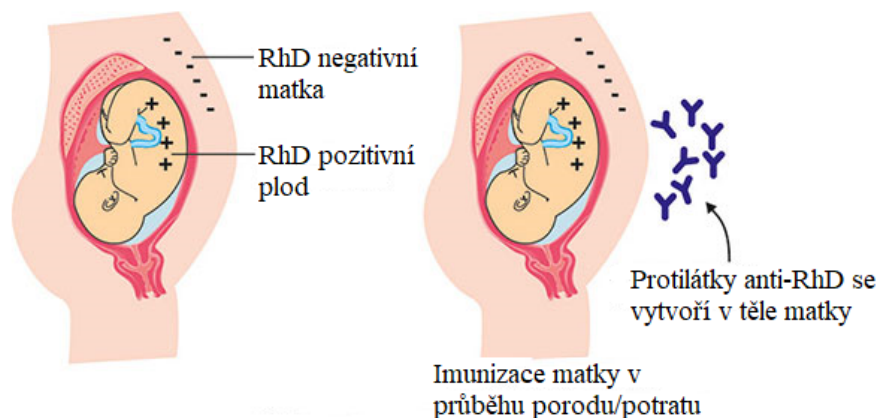
3.2.3 Aloimunitní hemolytická anémie

Tato nemoc vzniká při podání inkompatibilní transfúze. Nejprudší reakce nastává při podání nesprávné transfúze v AB0 systému. V takovém případě k reakci dojde do několika minut již po podání 10 ml této transfúze. Příznaky jsou horečka, zimnice, hypotenze a nakonec šok. V případě potvrzení je léčebným postupem přerušení transfúze, stabilizace krevního tlaku, protišoková léčba a časná hemodialýza. Pro toto onemocnění je zásadní prevence záměny v krevní bance, a to dodržením všech postupů při odběru, vyšetřeních, dokumentaci a vydání transfúzního přípravku (Dhaliwal et al, 2004).

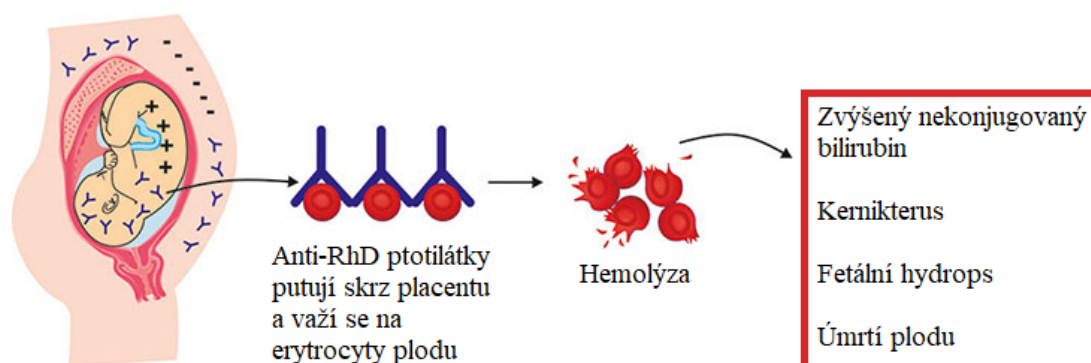
K aloimunitní hemolytické anémii může dojít také při transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Při takovéto transplantaci jsou přítomny dárcovské lymfocyty, které mohou produkovat protilátky proti erytrocytům příjemce. K takové hemolýze může docházet i při transplantacích celých orgánů, kdy je závažnost hemolýzy přímo úměrná množství lymfocytů v transplantovaném orgánu. Nejnižší stupeň následné hemolýzy hrozí při transplantaci ledvin a nejvyšší při transplantaci srdce, nebo plic. Tímto způsobem zprostředkovaná hemolýza může být velmi závažná, ale vždy je pouze dočasná, protože lymfocyty v dárcovském orgánu nemají schopnost proliferace (Hoffman, 2009).

Podkategorií tohoto onemocnění je hemolytické onemocnění novorozence, ke kterému dochází například při inkompabilitě Rh systému mezi matkou a plodem. K reakci dochází nejčastěji v průběhu porodu, pokud je RhD negativní matka již imunizována anti-RhD a plod je RhD pozitivní (Davenport et al, 2016). Důsledky tohoto onemocnění jsou zvýšený nekonjugovaný bilirubin, kernikterus (poškození způsobené ukládáním bilirubinu do mozkové tkáně), fetální hydrops (hromadění tekutin v extravaskulárním prostoru plodu), nebo až úmrtí plodu (obr. 10) (Ramadas et al, 2012).

První těhotenství



Druhé těhotenství



Obrázek 10 – **Hemolytické onemocnění novorozence** (RhD – Rh protein s antigenem D), (upraveno dle Ramadas et al, 2012).

3.2.4 Léky indukovaná hemolytická anémie

Léky indukovaná anémie má tři mechanismy účinku. Prvním mechanismem je obalení erytrocytu molekulami léčiva, což stimuluje tvorbu IgG protilátek. K tomu dochází například při vysokém dávkování penicilinu (Dhaliwal et al, 2004). Druhým mechanismem je tvorba imunitního komplexu, lék v oběhu stimuluje tvorbu IgM protilátek, se kterými poté vytvoří komplex. Tento komplex se naváže na membránu erytrocytu a způsobí stimulaci komplementu. V tomto případě jde především o léčiva s antimikrobiálním účinkem, například cefotetan, ceftriaxon, tetracyklin a piperacillin. Nejčastějším léčivem způsobující tyto komplikace je fludarabin, který je používán jako chemoterapeutikum při léčbě lymfomu, nebo leukémie (Garratty, 2010). Posledním typem je přímá produkce protilátek typu IgG namířených proti erytrocytům. V tomto případě je tvorba protilátek indukovaná pouhou přítomností léčiva, kterým může být například ibuprofen (Dhaliwal et al, 2004).

Lékem zprostředkovaná hemolytická anémie je velmi vzácná, její četnost je 0,1:100000. Z důvodu komplikovaného určení diagnózy bývá často fatální. Léčba spočívá ve vysazení škodlivého léčiva a následnému podávání steroidů v kombinaci s transfúzí erytrocytů a plazmaferézou (Garratty, 2010).

3.2.5 Infekcí zprostředkovaná hemolytická anémie

Autoimunitní hemolýza se vyskytuje jako komplikace těžkých zápalů plic způsobených druhem *Mycoplasma pneumoniae*. Hemolýza je způsobena chladovými protilátkami namířenými proti antigenu přítomnému na povrchu erytrocytů a respiračním epitelu. Protilátky jsou aktivovány sníženou teplotou v končetinách, při čemž se váží na erytrocyty. Navázáním je aktivován komplement a k hemolýze dochází prostřednictvím TCC (Widén et al, 2023).

Chladové protilátky jsou pozorovány asi u 50–60 % infekcí *M. pneumoniae* a u většiny z nich je také pozorováno zvýšené množství retikulocytů. Zpravidla se jedná jen o laboratorní odchylky a k život ohrožující hemolýze dochází jen vzácně. Hemolýza asociovaná s *M. pneumoniae* obvykle odezní s vyléčením infekce, avšak v akutních případech hemolýzy je podávána transfúze erytrocytů (Kurugol et al, 2012).

4. Autoimunitní hemolytická anémie s tepelnými protilátkami

4.1 Důvody vzniku onemocnění

Je několik příčin rozvoje WAIHA, přibližně 5 % je způsobeno infekcemi a léky. WAIHA vzniklá tímto způsobem je obvykle přechodná a dobře léčitelná. Jakýkoliv patogenní mikroorganismus může být původcem infekce vedoucí k WAIHA, nejčastěji se však jedná o HIV (lidský virus imunitní nedostatečnosti), virus Epstein-Barrové, virus hepatitidy typu C a za bakterie se nejčastěji jedná o druhy: *Brucella melitensis* a *Mycobacterium tuberculosis*. Lékem způsobené WAIHA lze rozdělit do dvou skupin podle mechanismu účinku. Častější variantou je, když se molekuly léčiva nekovalentně váží přímo na antigeny erytrocytu. V takovém případě je imunitní odpověď vyvolána pouze za přítomnosti léčiva, k tomu dochází při vysokém dávkování penicilinu, nebo cefalosporinu. Druhým mechanismem je tvorba protilátek přetrvávajících i v nepřítomnosti léčiva. Mezi léky způsobující tento typ WAIHA patří například antineoplastika, jako je oxaliptatin (Jäger et al, 2020). Přibližně 45 % případů WAIHA je idiopatických a mohou být jak akutní, tak chronické (Kuter, 2022). Asi 50 % případů WAIHA je sekundárních. Polovina případů sekundární WAIHA doprovází

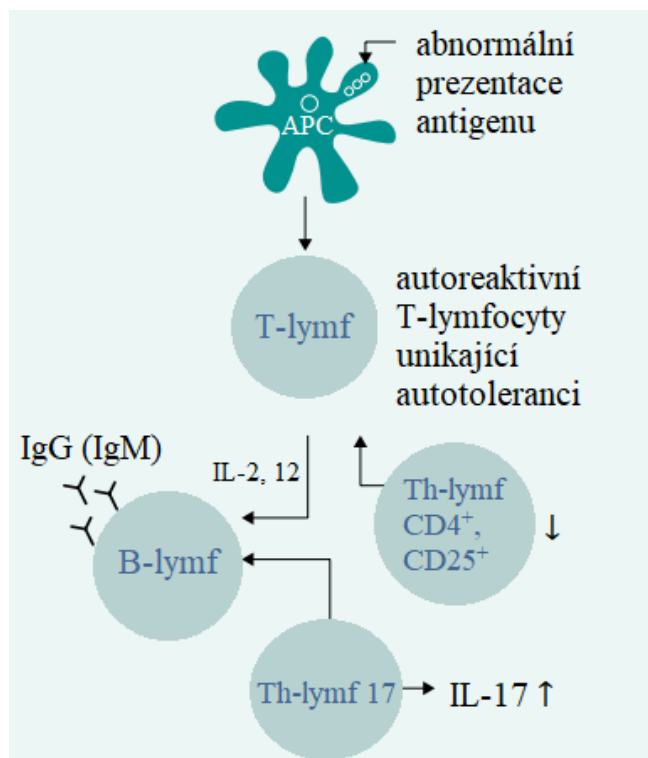
lymfoproliferativní onemocnění, nejčastěji chronickou lymfocytární leukémií. Druhá polovina má imunitní původ a mezi tato onemocnění patří systémový lupus erythematosus a imunitní trombocytopenie (Fattizzo et al, 2022).

Ojedinelým případem je rozvoj WAIHA v těhotenství. Mateřské IgG autoprotilátky procházejí placentou a způsobují fetální anémii, což může způsobit spontánní potraty i pozdní ztrátu plodu (12. – 28. týden). Po porodu je pupečnicková krev testována Coombsovým přímým testem, který je obvykle pozitivní na mateřské autoprotilátky. Pozitivní výsledek testu je impulz pro monitoring novorozence, kvůli rozvoji hemolytické anémie s opožděným nástupem ve 4. – 6. týdnu života novorozence (Jäger et al, 2020).

4.2 Mechanismus hemolýzy

Protilátky typu IgG proti antigenům na povrchu erytrocytů jsou převážně polyklonální a jsou produkovány v kostní dřeni, nebo ve slezině. Méně často se vyskytující IgM protilátky bývají monoklonální a jsou produkovány pouze v kostní dřeni (Fattizzo et al, 2022). Vznik protilátek namířených proti erytrocytům je způsoben ztrátou imunologické tolerance vůči exprimovaným antigenům na povrchu erytrocytů, a to je způsobeno třemi procesy. Prvním je porucha prezentace antigenů imunokompetentním buňkám. Tento jev vzniká zásluhou defektu na antigen prezentujících buňkách, které abnormálně prezentují antigenní podnět (obr. 11). Druhým mechanismem je porucha tolerance T-lymfocytů vůči autoantigenům. Tato porucha autotolerance vzniká z nerovnováhy mezi prozánětlivými a protizánětlivými procesy (Čermák et al, 2018).

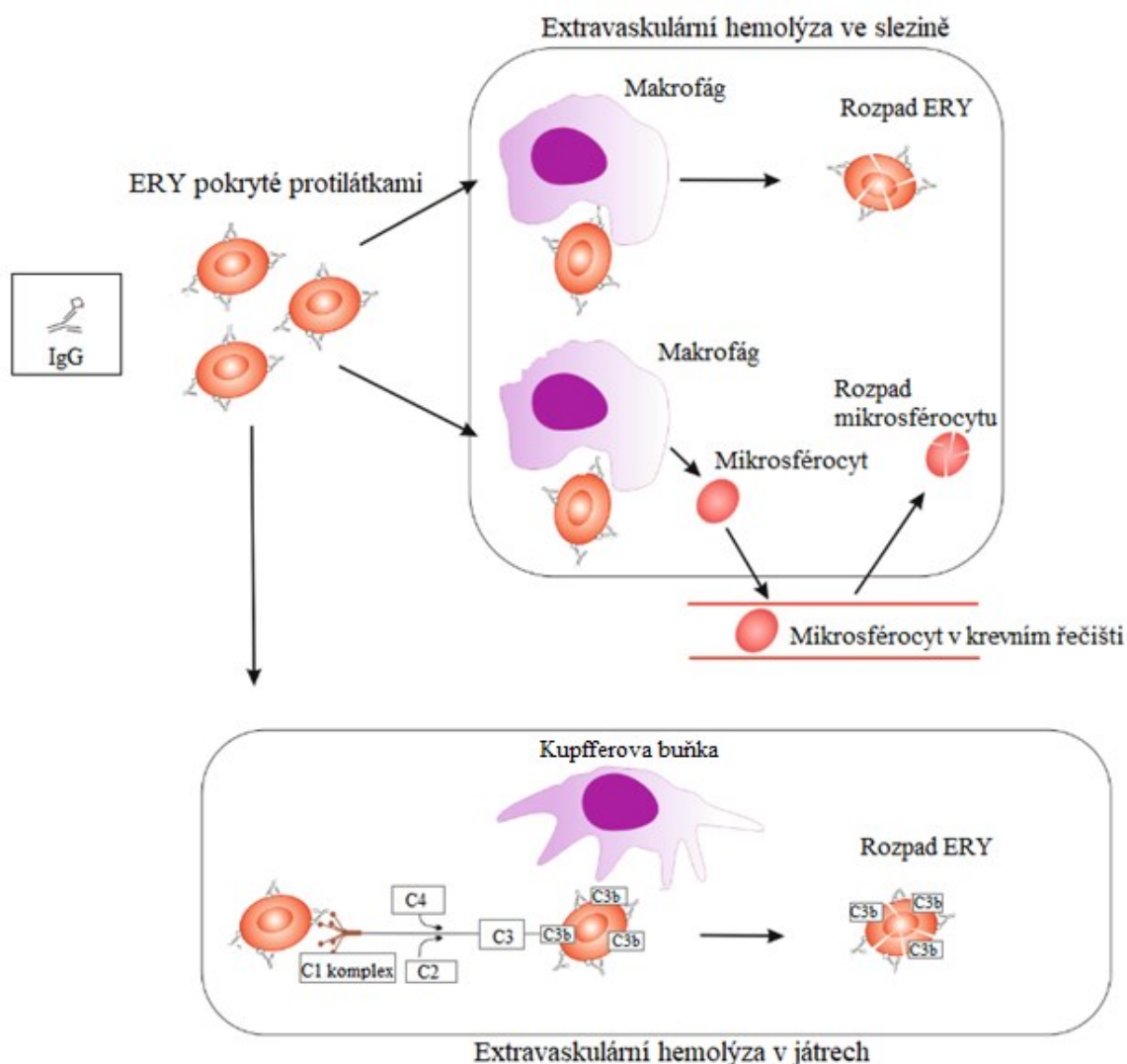
U AIHA je často nacházen zvýšený počet Th17-lymfocytů, které produkují interleukin 17 (IL-17). IL-17 se uplatňuje při stimulaci autoreaktivních T-lymfocytů a celé zánětlivé reakce. Zároveň se objevuje snížený počet $CD4^+$ a $CD25^+$ Th-lymfocytů, jejichž funkcí je inhibice Th17-lymfocytů. Touto nerovnováhou dochází k nadprodukci IL-17 (obr. 11). Posledním a nejvýznamnějším mechanismem je indukce tvorby autoprotilátek. Díky zvýšené hladině IL-17 dochází k aktivaci autoreaktivních T-lymfocytů, které umožňují přeměnu Th0 na Th1-lymfocyty. Th1-lymfocyty indukují tvorbu IL-2, IL-12 a tumor nekrotizujícího faktoru β , které stimulují tvorbu protilátek B-lymfocyty (obr. 11) (Kalfa, 2016).



Obrázek 11 – Mechanismus vzniku protilátek namířených proti erythrocytům (APC – antigen prezentující buňka, IL – interleukin, lymf – lymfocyt, Th-lymf – pomocný lymfocyt), (upraveno dle Čermáka et al, 2018).

Po vytvoření IgG protilátek (v 5 % případů IgM) dojde k navázání protilátky na antigen na erythrocytu, pokud je pro tyto protilátky vhodná teplota. Hlavními vazebnými místy na membráně jsou glykoforiny a Rh komplex. Poté k lýze erythrocytu může dojít několika mechanismy. Nejčastěji je protilátkou označený erythrocyt vychytán makrofágem ve slezině přes receptor $Fc\gamma RIII$, ztrácí většinu své cytoplazmy a opouští slezinu jako mikrosférocyt. Mikrosférocyt je menší erythrocyt, který má kulatý tvar, ztrácí centrální projasnění a deformovatelnost. Je uvolněn do krevního oběhu, ale kvůli snížené deformovatelnosti již znovu nedokáže projít kapilárami ve slezině, kde se rozpadá (obr. 12). Méně často je celý erythrocyt makrofágem ve slezině přímo fagocytován (obr. 12) (Kuter, 2022).

Glykoforiny mají dostatečnou hmotnost pro aktivaci komplementu, proto po navázání protilátky dojde k aktivaci C1 a C3b složek komplementu. Při vysokém titru protilátek dojde k další aktivaci a erythrocyt podléhá intravaskulární hemolýze prostřednictvím TCC. Obvykle je titer protilátek nízký a erythrocyt je pokryt meziproductem aktivace komplementu C3b. Označený erythrocyt je rozeznán receptorem v jaterních Kupfferových buňkách a zde podléhá extravaskulární hemolýze (obr. 12) (Čermák et al, 2018).



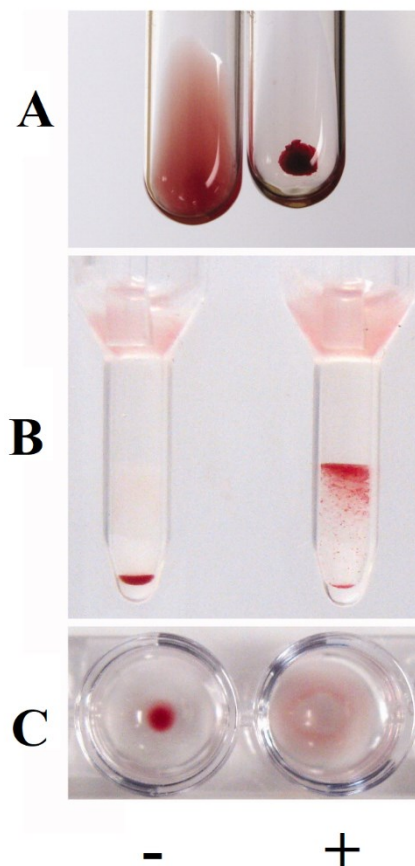
Obrázek 12 – Mechanismus hemolýzy u WAIHA (C – komplement, ERY – erytrocyt, IgG – imunoglobulin typu G), (upraveno dle Michalak et al, 2020).

4.3 Příznaky onemocnění a diagnóza

Jde o onemocnění s velkou škálou nespecifických příznaků. Zároveň jde o onemocnění s různou mírou závažnosti v závislosti na charakteru působících protilátek a mechanismu hemolýzy. Mírnější formy WAIHA, nebo při silné kompenzaci hemolýzy, je onemocnění zcela bez příznaků. Při střední a silnější formě dochází k hypoxii tkání, což vede k příznakům jako je dušnost, únava, malátnost, závratě a bolesti na hrudi. Ke splenomegalii, žloutnutí kůže a vzniku žlučových kamenů dochází až v akutních případech, obvykle pokud WAIHA doprovází lymfoproliferativní onemocnění (Kuter, 2022). Ve fatálních případech je důvodem úmrtí zpravidla plicní embolie. Ke vzniku trombů dochází

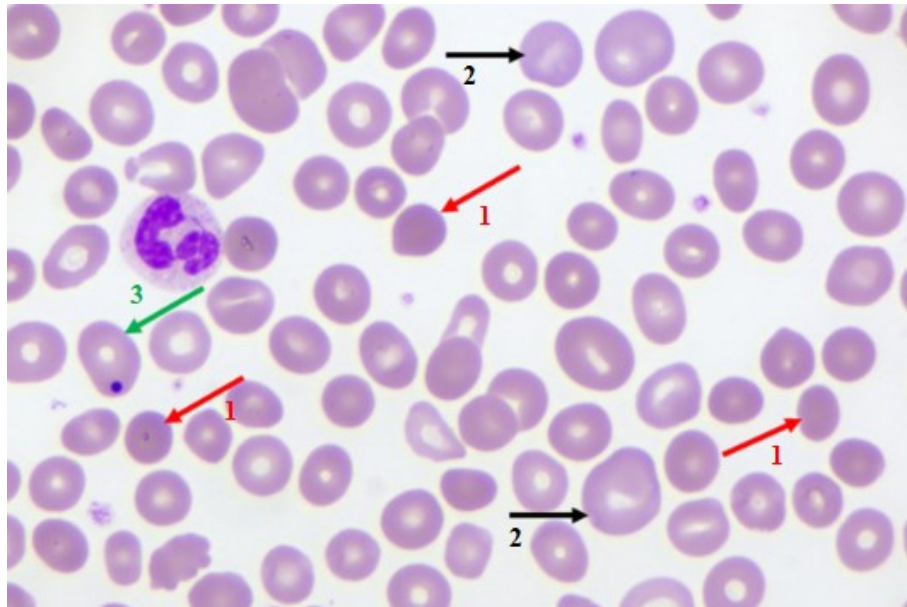
kvůli narušeným membránám erytrocytů. Z narušených membrán uniká fosfatidylserin, který indukuje tvorbu protrombinových komplexů (Hoffman, 2009).

Základním diagnostickým testem je přímý Coombsův test, který potvrdí přítomnost IgG protilátek, a meziprodukt komplementu C3b, nebo C3d (C3b po rozpadu v Kupfferových buňkách někdy konvertuje na C3d) (obr. 13). Při nízkém titru protilátek lze pro jejich detekci použít průtokovou cytometrii (Lechner et al, 2010). V případě negativního nálezu těchto markerů je stejnou technikou testována i přítomnost IgM a IgA protilátek. Nejčastěji však jde o převažující protilátky typu IgG1 v kombinaci s IgG3. Pokud se vyskytuje pouze IgG3 zpravidla nedochází k hemolýze a komplikacím ani při vysokém titru protilátek (přítomnost těchto protilátek byla zjištěna u dárců krve) (Kruhonja et al, 2020).



Obrázek 13 – **Přímý Coombsův přímý test** (po přidání protilátek proti lidským sérovým globulinům ke vzorku krve dojde ke shlukování erytrocytů, pokud jsou na nich navázány antierytrocytální protilátky/produkty komplementu. Aglutinace erytrocytů je detekována A: vizuálně ve zkumavce, B: mikrokolonkovou metodou, jako selhání filtrace shluků přes gelovou matici, C: metodou na pevné fázi jako nepřilnutí shluků k povrchu, na rozdíl od volných erytrocytů), (Zantek et al, 2012).

Typickým nálezem jsou mikrosférocyty a retikulocyty v krevním nátěru. Obvykle se objevují také Howell-Jollyho tělíska (obr. 14). Dalším významným markerem je důkaz hemolýzy, což jsou zvýšená koncentrace nekonjugovaného bilirubinu, zvýšená aktivita laktátdehydrogenázy a nepřítomnost haptoglobinu v séru, a dále také zvýšené množství urobilinogenu v moči (Michalak et al, 2020).

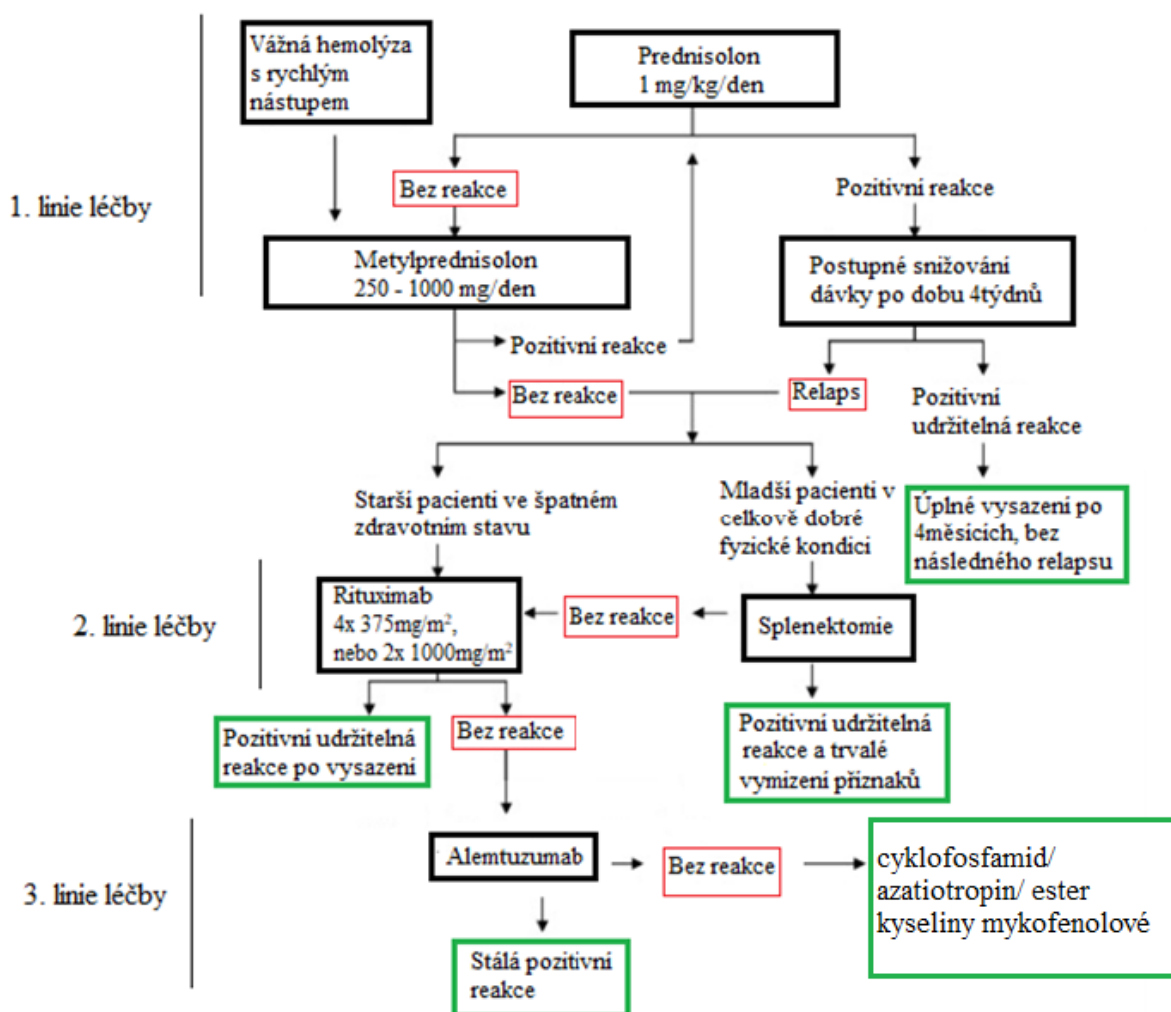


Obrázek 14 – Krevní nátěr u WAIHA (1 – mikrosférocyt, 2 – polychromatický retikulocyt, 3 – Howell-Jollyho tělíska), zvětšeno 400x, (Kuter, 2022).

4.4 Léčba

Kostní dřevň má velkou schopnost kompenzace, je schopna zvýšit produkci erytrocytů až 8krát, aby pokryla ztráty. U pacientů s mírnou variantou WAIHA umožňuje pouze kostní dřevň dostatečnou kompenzaci bez potřeby další léčby. Zvýšení produkce erytrocytů je možné, pokud je dodán dostatek kyseliny listové, vitamínu B₁₂ a železa (Kuter, 2022). V kritických případech je prvním léčebným postupem transfúze erytrocytů pro zvýšení hladiny hemoglobinu. V takových situacích je často nemožné najít sérologicky kompatibilního dárce. Doporučovaným postupem je rychlé podání asi 20 ml vybrané transfúze, poté přerušení na 30 minut, a pokud je příjemce bez negativní reakce, pokračovat v transfúzi normální rychlostí (Berentsen et al, 2019). Využívá se také podávání plazmy s albuminem za účelem odstranění patologických imunokomplexů, autoprotilátek a aktivovaných složek komplementu z oběhu (Jäger et al, 2020).

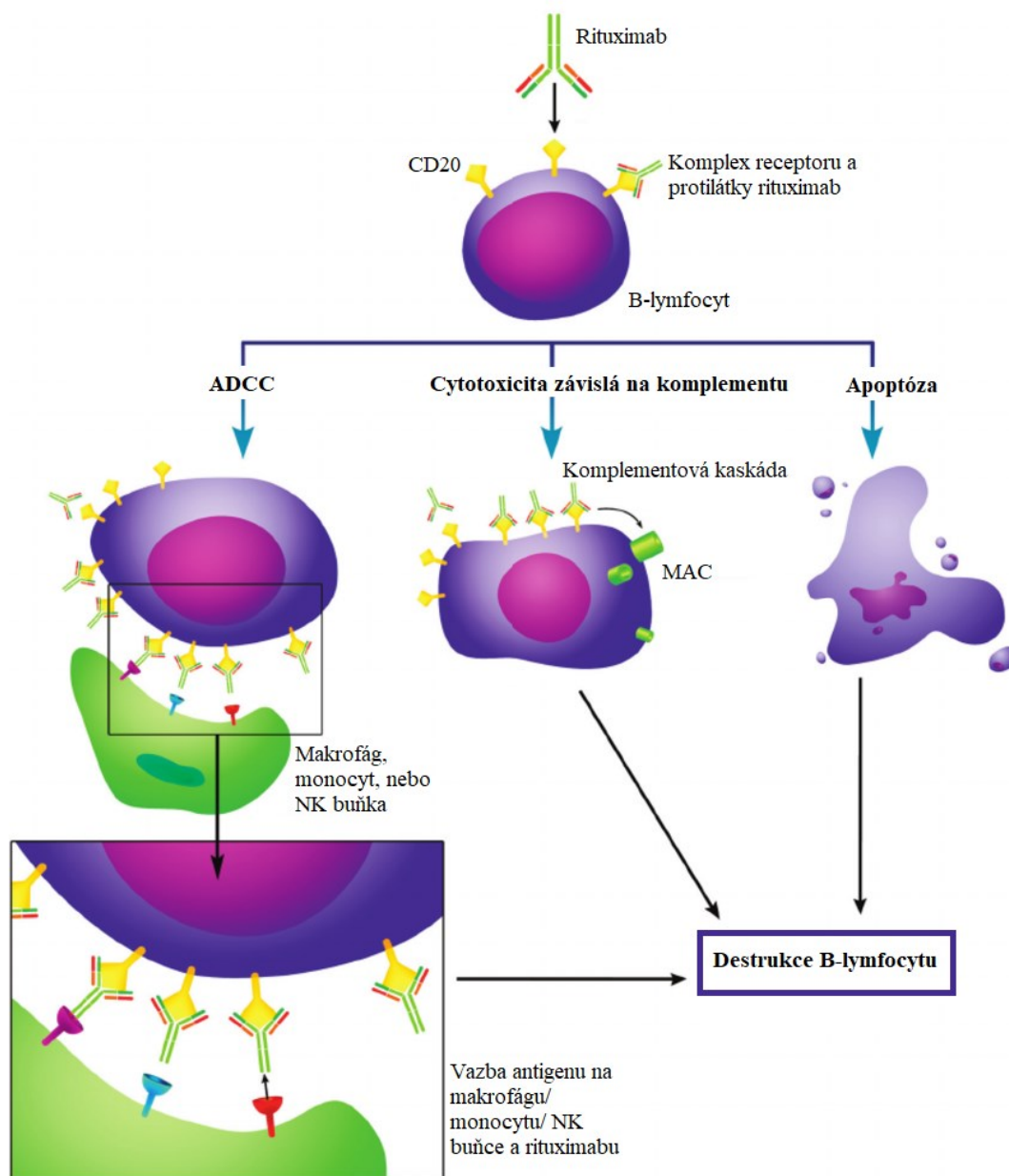
Léčbou první linie je podávání kortikosteroidů, jejichž cílem je zvednout hodnoty hemoglobinu alespoň nad 100 g/l. Prvním podávaným kortikosteroidem je metylprednisolon podávaný 1–3 dny v koncentraci 250–1000 mg/den. V případě pozitivní reakce a u nemocných s lehčí formou je podáván prednison 1 mg/kg/den po dobu 4 týdnů (Sudulagunta et al, 2017). Kortikosteroidy mohou být podávány jako monoterapie, nebo v kombinaci imunoglobuliny. Po ustálení hladiny hemoglobinu je možné postupně snižovat dávkování kortikosteroidů až do dosažení trvale fyziologických hodnot hemoglobinu. Celková doba léčby obvykle trvá 4 měsíce (obr. 15) (Čermák et al, 2018).



Obrázek 15 – Schéma léčby WAIHA, (upraveno dle Barros et al, 2020).

Přestože na léčbu kortikosteroidy většina pacientů reaguje dobře, v některých případech ztrácí citlivost a vyžadují další terapii. V takovém případě přichází na řadu léčba druhé linie. Tou je pro pacienty mladší 65 let v celkově dobré fyzické kondici laparoskopicky provedená splenektomie (obr. 15). Zlepšení stavu po provedení splenektomie nastává přibližně v 75 % případů, avšak tento zákrok s sebou nese riziko trombózy a infekce (Hill et al, 2018).

U pacientů, u nichž nebyla indikována splenektomie, a u pacientů, u kterých splenektomie neprokázala účinek, je podáván rituximab. Rituximab je podáván ve čtyřech dávkách v koncentraci 375 mg/m², nebo ve dvou dávkách o koncentraci 1000 mg/m² (obr. 15). Rituximab je monoklonální protilátka mířená proti B-lymfocytům a její podávání a je obvykle dobře snášeno (Sudulagunta et al, 2017). Léčba rituximabem funguje na principu destrukce B-lymfocytů a tím redukuje tvorbu patologických protilátek. Rituximab způsobuje destrukci B-lymfocytů třemi způsoby. Po navázání rituximabu na B-buňku dochází ke spuštění buněčné cytotoxicity, komplementové kaskády, nebo apoptózy (obr. 16) (Selewski et al, 2010).



Obrázek 16 – Působení rituximabu na B-lymfocyty (ADCC – buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách, MAC – membránu atakující komplex, NK – přirozený zabiják), (upraveno dle Selewski et al, 2010).

Léčivý třetí linie jsou imunosupresiva. Prvním podávaným imunosupresivem je alemtuzumab. Alemtuzumab je monoklonální protilátka mířená proti leukocytům. V léčbě WAIHA je účinný, ale jeho užívání je omezené, protože hrozí velmi vážná lymfopenie. V případě neúčinnosti alemtuzumabu se využívají další léky podávané v nízkých koncentracích, jako jsou cyklofosfamid 100 mg/den a azatioprin 100-200 mg/den (obr. 15). Účinnost těchto léčiv je 25–40 %, avšak často je užívání doprovázeno přetrvávajícími cytopeniemi (Barros et al, 2020). U azatioprinu je možnost vedlejšího účinku v podobě těžké

hematologické cytotoxicity, proto u uživatelů azatioprinu musí být monitorován dostatek thiopurinmethyltransferázy (Čermák et al, 2018).

Ester kyseliny mykofenolové je další možností léčby (obr. 15). Jde o imunosupresivo potlačující proliferaci lymfocytů zabráněním syntézy guanosinových nukleotidů. Obvykle je používán při transplantacích orgánů jako prevence odmítnutí příjemcem. Při léčbě WAIHA byl doposud použit jen několikrát a dostavily se jen částečné účinky, které nebyly dlouhotrvající (Barros et al, 2020).

V případě, že u vyléčeného pacienta znovu propukne WAIHA, začíná jejich léčba opět steroidy, avšak pro dosažení stejného účinku musí být podávány vyšší dávky steroidů (Sudulagunta et al, 2017). Mnoho pacientů je tak léčeno nadměrnými dávkami kortikosteroidů po nevhodně dlouhou dobu. Z toho důvodu jsou vyvíjeny nové metody léčby, jejichž cílem je snížení tvorby autoprotilátek. Jde například o inhibitory imunoproteazomu, jako je bortezomib. Další skupinou vyvíjených léčiv jsou látky se schopností inhibovat mediátory fagocytózy, jako je tyrosinkináza makrofágů takovým lékem je fostamatiniib. Tyto léky sice prokázaly jisté zlepšení, ale léčbu doprovází celá řada vedlejších účinků a jejich využití k léčbě neposkytuje stabilní výsledky. Další možností je využití inhibitorů faktorů komplementu C1 a C3 (Kuter, 2022).

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo popsat jednotlivé typy autoimunitních hemolytických anémií, seznámením s mechanismy jejich vzniku, četností, příznaky a léčbou. Práce se zabývala především autoimunitní hemolytickou anémií (AIHA). AIHA je možno rozdělit podle specifické teploty, na AIHA s tepelnými, anebo chladovými protilátkami. AIHA s chladovými protilátkami se dělí na dva podtypy, nemoc chladových aglutininů a paroxysmální chladovou hemoglobinurii. Dále byl v práci probírán Evansův syndrom, aloimunitní hemolytická anémie a léky a infekcí indukované hemolytické anémie.

Největší pozornost byla v práci věnována autoimunitní hemolytické anémii s tepelnými autoprottilátkami (WAIHA). Jde o onemocnění, jehož vznik může mít několik příčin, jako je reakce na infekci, nebo léky, avšak velká část případů je idiopatických. Přibližně polovina případů WAIHA je sekundární a komplikuje tak lymfoproliferativní, nebo autoimunitní onemocnění. Účinkující tepelné autoprottilátky se na membráně erytrocytu váží na glykoforiny, nebo Rh komplex. Tyto protilátky jsou obvykle typu IgG, v 5 % případů IgM. Pro diagnózu je stěžejní pozitivní Coombsův přímý test. V krevním nátěru se objevují mikrosférocyty a retikulocyty. Biochemickými markery jsou zvýšené koncentrace nekonjugovaného bilirubinu a laktátdehydrogenázy v séru a zvýšené množství urobilinogenu v moči. Léčbou první linie je podávání kortikosteroidů, v případě nedostatečné reakce se přechází k léčbě druhé linie. Tento stupeň léčby zahrnuje podávání rituximabu a provedení splenektomie. Léčbou třetí linie je podávání imunosupresiv: alemtuzumabu, cyklofosfamidu, azatioprinu, nebo esteru kyseliny mykofenolové.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ANDOLFO I, RUSSO R, GAMBALE A, IOLASCON A: New Insights on Hereditary Erythrocyte Membrane Defects. *Haematologica*, **2016**, 101 (11), 1284-1294.
2. AUDIA S, GRIENAY N, MOUNIER M, MICHEL M, BONNOTTE B: Evans' Syndrome: From Diagnosis to Treatment. *Journal of Clinical Medicine*, **2020**, 12 (9), 1–20.
3. AVENT ND, REID ME: The Rh Blood Group System. *Blood*, **2000**, 95 (2), 375–387.
4. BARROS MMO, BLAJCHMAN MA, BORDIN JO: Warm Autoimmune Hemolytic Anemia: Recent Progress in Understanding the Immunobiology and the Treatment. *Transfusion Medicine Reviews*, **2010**, 195-210.
5. BASS GF, TUSCANO ET, TUSCANO JM: Diagnosis and Classification of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Autoimmunity Reviews*, **2014**, 1, 560-564.
6. BERENTSEN S, BARCELLINI W, D'SA S, RANDEN U, TVEDT THA: Cold Agglutinin Disease Revisited: a Multinational, Observational Study of 232 Patients. *Blood*, **2020**, 136 (4), 480–488.
7. BERENTSEN S, HILL A, HILL QA, TVEDT THA, MICHEL M: Novel Insights into the Treatment of Complement-mediated Hemolytic Anemias. *Therapeutic Advances in Hematology*, **2019**, 10.
8. BERENTSEN S: Cold Agglutinin Disease. *Hematology American Society, Hematology Education Program*, **2016**, 1, 226–231.
9. BEUTLER E: Production and Destruction of Erythrocytes. *Williams hematology*, Medical Pub Division, New York, **2001**, 355-368. ISBN: 9780070703971.
10. BHATNAGAR N, KOHLI M, FATIMA A: Evan's Syndrome – A Case Report. *Haematology International Journal*, Medwin Publishers, **2020**, 4 (2), 1–3.
11. COLLIE JC, LOCKEY RF, KALINEC MA: Cold Agglutinin Disease Workup. *Medscape*, **2023**.
12. ČERMÁK J, PÍSAČKA M: Autoimunitní hemolytická anémie. *Vnitřní lékařství, Česká internistická společnost*, **2018**, 64 (5), 514–519.

13. DAVENPORT RD, BLUTH MH: Rossi's Principles of Transfusion Medicine Hazards of transfusion, Chapter 57: Hemolytic Transfusion Reactions. Wiley Online Library, **2016**, 642–651. ISBN: 9781119012993.
14. DE OLIVEIRA S, SALDANHA C: An Overview about Erythrocyte Membrane. Clinical Hemorheology and Microcirculation, **2010**, 44 (1), 63-74.
15. DEAN L: Blood Groups and Red Cell Antigens, Chapter 2: Blood Group Antigens are Surface Markers on the Red Blood Cell Membrane. National Center for Biotechnology Information, **2005**, 2, 11–25.
16. DHALIWAL G, CORNETT PA, TIERNEY LM: Hemolytic Anemia. American Family Journal, **2004**, 69 (11), 2599-2607.
17. DZIERZAK E, PHILIPSEN S: Erythropoiesis: Development and Differentiation. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, **2013**, 4 (3).
18. FAIRWEATHER DL: Autoimmune Diseases: Mechanisms. John Wiley Online Library, Encyclopedia of Life Sciences, **2007**, 1-6.
19. FATTIZZO B, BARCELLINI W: Autoimmune Hemolytic Anemia: Causes and Consequences. Expert Review of Clinical Immunology, **2022**, 18 (7), 731-745.
20. GABBARD AP, BOOTH GS: Cold Agglutinin Disease. Clinical Hematology International, **2020**, 3 (2), 95–100.
21. GARRATTY G: Immune Hemolytic Anemia Associated with Drug Therapy. Blood Reviews, **2010**, 143-150.
22. GEHRS BC, FRIEDBERG RC: Autoimmune Hemolytic Anemia. American Journal of Hematology, **2002**, 69 (4), 258–271.
23. GERPE M: Types of Antibodies. Rapid Novor, Antibody and Protein Sequencing, Discovery & Characterization Company, **2021**.
24. HADJADJ J, ALADJIDI N, FERNANDES H, LEVERGER G, MAGÉRUS-CHATINET A: Pediatric Evans Ayndrome is Associated with a high Frequency of Potentially Damaging Variants in Immune Genes. Blood, **2019**, 134 (1), 9–21.
25. HILL A, HILL QA: Autoimmune Hemolytic Anemia. Hematology. American Society of Hematology. Education Program, **2018**, 1, 382–389.

26. HOFFMAN PC: Immune Hemolytic Anemia—selected topics. Hematology American Society, Hematology Education Program, **2009**, 1, 80–86.
27. JACOBS JW, FIGUEROA-VILLALBA CA, BOOTH GS, WOO JS, STEPHENS LD et al: Clinical and Epidemiological Features of Paroxysmal Cold Hemoglobinuria: a Systematic Review. Blood Adventures, **2023**, 11 (7), 2520–2527.
28. JÄGER U, BARCELLINI W, CATHERINE M, BROOME CM, GERTZ MA et al: Diagnosis and Treatment of Autoimmune Hemolytic Anemia in Adults: Recommendations from the First International Consensus Meeting. Blood Reviews, Science Direct, **2020**, 1–17.
29. KALFA TA: Warm Antibody Autoimmune Hemolytic Anemia. Hematology American Society, Hematology Education Program, **2016**, 1, 690–697.
30. KEOHANE EM, WALENGA JM, SMITH LJ, RODAK BF: Erythrocyte Production and Destruction. Rodak's Hematology Clinical Principal and Applications, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, **2016**. 5, 95-107. ISBN: 9780323327169.
31. KIM C, COLIN Y, CARTRON JP: Rh Proteins: Key Structural and Functional Components of the Red Cell Membrane. Blood Reviews, **2006**, 20 (2), 93-110.
32. KRUHONJA ZG, JAGNJIC S, BINGULAC-POPOVIC J, PLANINC PERAICA A, HECIMOVIC A et al: Warm Red Blood Cell Autoantibodies and Clinical Diagnoses in Patients with or without Autoimmune Hemolysis. Transfusion Clinique et Biologique, **2020**, 25-29.
33. KURUGOL Z, ONEN SS, KOTUROGLU G: Severe Hemolytic Anemia associated with Mild Pneumonia caused by *Mycoplasma pneumoniae*. Case Reports in Medicine, **2012**, 1–3.
34. KUTER DJ: Warm Autoimmune Hemolytic Anemia and the best Treatment Strategies. Ash Publications, Hematology, **2022**, 1, 105-113.
35. LECHNER K, JÄGER U: How I Treat Autoimmune Hemolytic Anemias in Adults. Blood, **2010**, 1831-1838.
36. LI W, REDDIVALLA N: Paroxysmal Cold Hemoglobinuremia: Florid erythrophagocytosis by neutrophils in peripheral blood. American Society of Haematology, **2016**, 128, 739.

37. LUX SE: Anatomy of the Red Cell Membrane Skeleton: Unanswered Questions. *The Journal of the American Society of Hematology*, **2016**, 127 (2), 187-199.
38. LYKOTRAFITIS G, LI H: Erythrocyte Membrane Model with Explicit Description of the Lipid Bilayer and the Spectrin Network. *Biophysical Journal*, **2014**, 107 (3), 642-653.
39. MICHALAK SS, OLEWICZ-GAWLIK A, RUPA-MATYSEK J, WOLNY-ROKICKA E, GIL L et al: Autoimmune Hemolytic Anemia: Current Knowledge and Perspectives. *Immunity & Ageing*, Springer Nature, **2020**, 38 (17), 1–14.
40. MOHANDAS N, GALLAGHER PG: Red Cell Membrane: Past, Present, and Future. *Blood*, **2008**, 112 (10), 3939–3948.
41. MOHANDAS N: Inherited Hemolytic Anemia: a Possessive Beginner’s Guide. *American Society of Hematology*, **2018**, 379–380.
42. PÉREZ J, CARLOS J, AGUILAR-CALDERÓN PE, SALAZAR-CAVAZOS L, GÓMEZ-ALMAGUER D: Evans syndrome: Clinical Perspectives, Biological Insights and Treatment Modalities. *Journal of Blood Medicine*, **2018**, 9, 171–184.
43. PISETSKY DS: Pathogenesis of Autoimmune Disease. *Nature Review Nephrology*, **2023**, 19, 509–524.
44. POURAZAR A: Red Cell Antigens: Structure and Function. *Asian Journal of Transfusion Science*, **2007**, 1, 24–32.
45. RAMADAS N, SHARADA R, ASTHA G: Essentials in Hematology and Clinical Pathology, Chapter 10: Immuno-hemolytic Anemia. Jaypee Brothers Medical Publishers, **2012**, 5 (1), 96–105. ISBN: 9789350255995.
46. REID ME, MOHANDAS N: Red Blood Cell, Blood Group Antigens: Structure and Function. *Seminars in Hematology*, WB Saunders, **2004**, 2, 93-117.
47. SELEWSKI D, SHAH G, MODY R, RAJDEV P, MUKHERJI SURESH: Rituximab (Rituxan). *American Journal of Neuroradiology*, **2010**, 31 (7), 1178-80.
48. SHANBHAG S, SPIVAK J: Paroxysmal Cold Hemoglobinuria. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **2015**, 473-478. ISBN: 9780323388900.
49. SHAZ BH: Transfusion Medicine and Hemostasis, Chapter 23: Rh Blood Group System. Academic Press, **2009**, 123-127. ISBN: 9780123744326.

50. SCHROEDER HW, CAVACINI L: Structure and Function of Immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **2010**, 41–52.
51. SIDDON AJ, TORMEY CA: *Advances in Clinical Chemistry, Chapter 6: The Chemical and Laboratory Investigation of Hemolysis*. Elsevier, **2019**, 215–258. ISBN: 9780128171455.
52. SLEMP SN, DAVISSON SM, SLAYTEN J, CIPKALA DA, WAXMAN DA: Two Case Studies and A Review of Paroxysmal Cold Hemoglobinuria. *Laboratory Medicine*, **2014**, 1, 253–258.
53. STEVENS-HERNANDEZ CJ, BRUCE LJ: Reticulocyte Maturation. *MDPI Journals, Membranes*, **2022**, 12 (3), 311.
54. SUDULAGUNTA SR, KUMBHAT M, SODALAGUNTA MB, SETTIKERE AN et al: Warm Autoimmune Hemolytic Anemia: Clinical Profile and Management. *Journal of Hematology*, **2017**, 6 (1), 12–20.
55. THIAGARAJAN P, PARKER CJ, PRCHAL JT: How Do Red Blood Cells Die?. *Frontiers in Physiology*, **2021**, 12.
56. VAILLANT AAJ, JAMAL Z, PATEL P, RAMPHUL K: *Immunoglobulin*. National Center for Biotechnology Information, StatPearls Publishing, **2023**.
57. WESTHOFF CM: The Structure and Function of the Rh Antigen Complex. *Seminars in Hematology* WB Saunders, **2007**, 44 (1), 42-50.
58. WIDÉN J, JÖNSSON G, KARLSSON U: Mycoplasma Pneumonia with Severe Cold Agglutinin Hemolysis, Thrombocytosis, Leukemoid Reaction and Acute Renal Failure. Elsevier, *ID Cases*, **2023**, 13–31.
59. WOOF JM, KERR MA: The Function of Immunoglobulin A in Immunity. *The Journal of Pathology, A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, **2006**, 208 (2), 270-282 (abstrakt).
60. ZANTEK ND, KOEPEL SA, THARP DR, COHN CS: The Direct Antiglobulin Test: A Critical Step in the Evaluation of Hemolysis. *American Journal of Hematology*, **2012**, 87, 707-709.
61. ZIVOT A, LIPTON JM, NARLA A, BLANC L: Erythropoiesis: Insights into Pathophysiology and Treatments. *BMC, Molecular Medicine*, **2017**, 1, 1-15.