

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО НАУЧНО ВЕЋЕ



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу број IV-03-594/37 од 09.09.2020. године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Драгана Гојков, под називом:

“Утицај термина инактивације патогена применом рибофлавина и ултравиолетног зрачења на интегритет конституената плазме у замрзнутој свежој плазми“

Чланови комисије су:

1. Проф. др Небојша Н. Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник;
2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан;
3. Проф. Др Бела Баљинт, дописни члан САНУ, научни саветник, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Трансфузиологија и експериментална хематологија, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу:

2. Извештај о оцени научне занованости теме докторске дисертације

2.1. Кратка биографија кандидата

Кандидат др Драгана Гојков рођена је 23. 07. 1967. године у Новом Саду, где после завршене средње природно-математичке гимназије, смер биологија, уписује студије медицине на Факултету медицинских наука, Универзитета у Новом Саду, а које завршава на Факултету медицинских наука, Универзитета у Београду, 1996. године са просечном оценом 8,58 и стиче звање доктора медицине. По завршетку обавезног лекарског стажа (КБЦ Звездара и ДЗ Звездара, Београд) и положеног стручни испит за доктора медицине, ради три године као лекар опште медицине у ДЗ Барајево, ДЗ „Др Симо Милошевић“ Б. Брдо, Београд и ВМЦ Нови Београд. Специјализацију из Трансфузиологије уписује 2000. године на Војномедицинској академији, а 2003, полаже специјалистички испит са оценом 5 и стиче звање специјалисте трансфузијске медицине. Почетком 2004. године добија постављење у Институту за трансфузиологију ВМА и од тада ради у различитим Одељењима / Одсецима на различитим положајима. Докторске академске студије уписује 2008. године, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

Наслов: Утицај термина инактивације патогена применом рибофлавина и ултравиолетног зрачења на интегритет конституената плазме у замрзнутој свежој плазми

Предмет: Овим истраживањем би се испитао ефеката система Mirasol-PRT на садржај протеина у замрзнутој свежој плазми (ЗСП) ако се она „инактивише” непосредно после издвајања из јединице целе крви, а пре складиштења и уколико је третирана након складиштења у замрзнутом стању, тј. после одмрзавања, а непосредно пре апликације.

Хипотеза: Поступак накнадне инактивације плазме системом Mirasol-PRT резултује очувањем квалитета ЗСП, пре свега терапијски ефективних концентрација стимулатора и инхибитора коагулације, што би омогућило примена овог третмана на ЗСП одређене крвне групе потребне у датом времену, за одређеног болесника.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат је објавио рад у целини у часопису категорије M51 који излази на једном од водећих светских језика у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

1. **Gojkov D**, Borovčanin N, Vučetić D. Sterility testing of platelets concentrate within quality control: experiences and opportunities to extend the application. Ser J Exp Clin Res. 2020; doi:10.2478/sjecr-2020-0014. **M51**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Замрзнута свежа плазма (ЗСП) је плазма припремљена из целе крви, било примарним центрифугирањем целе крви и следственим одвајањем (сепарацијом) еритроцита и плазме, било секундарним центрифугирањем плазме богате тромбоцитима. Издвојена плазма треба да буде замрзнута у року од 6 сати од колекције, и то рапидно, тј. на начин да за један сат јединица ЗСП у потпуности постиже температуру од -30°C . На тај начин, она садржи све факторе коагулације, укључујући лабилне чиниоце (факторе) V и VIII. Према препорукама Европског комитета (Водич за припрему, коришћење и обезбеђење квалитета компонената крви), ЗСП треба да садржи, у просеку, не мање од 70IU фактора VIII у 100ml. Индикације за примену ЗСП у клиничкој пракси су: клинички значајна дефицијенција фактора II, V, X и XI. ЗСП се најчешће користи код болесника са недостатком више фактора коагулације, укључујући оне са болестима јетре, дилуционом и потрошном коагулопатијом или за брзу надокнадну терапију приликом предозирања оралним антикоагулансом варфарином. Правилан одабир давалаца са акцентом на питањима о ризичном понашању и увођењем веома сензитивних серолошких тестова базираних на амплификацији и детекцији нуклеинских киселина (NAT) у рутинско тестирање дониране крви, учињен је велики напор да се смањи ризик од трансмисије патогена трансфузијом. Међутим, због постојања „прозор“ периода током којег постојећим тестовима није могуће открити присуство патогена, али и због патогена чија се детекција не ради рутински, а у циљу побољшања сигурности трансфузије, развијен је систем за редукацију/инактивацију патогена (систем ПР/ПИ) којим се постиже споменута инактивација патогена без оштећења нормалних конституената хемопродуката. Могући нежељени ефекти третмана инактивације патогена, поред дилуције плазматских конституената,

која настаје због додавања раствора РБ плазми, јесте промена у садржају плазматских протеина (прокоагулантни фактори, инхибитори, медијатори имунског одговора, итд.).

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај истраживања: На основу досадашње литературе, очекује се да ће анализа протеина у инактивисаној плазми у односу на нетретирану, као и евалуација оптималног и могућег времена за процес инактивације, омогућити примену процеса на ускладиштене јединице ЗСП према тренутној потреби, у односу на крвну групу пацијената.

Циљ истраживања: Циљеви овог истраживања би били увођење и усавршавање сопственог протокола за инактивацију јединица ЗСП, с тим што би генерални циљ био провера и процена састава и квалитета ЗСП третиране према нашем протоколу.

У складу са генералним циљем одређени су и конкретни задаци:

1. квантификовати у узорцима плазме пре и после третмана дефинисана обележја посматрања – тј. биохемијске, хемостазне и имунске параметре и упоредити резултате ових испитивања у оквиру сваке групе
2. упоредити резултате мултилабораторијских испитивања након примене Mirasol-PRT третмана стандардном методом (метода ПИ) и модификованом методом (метода НИ), тј. упоредити међугрупне разлике у односу на садржај и функционалну очуваност протеина у јединицама ЗСП, уз упоређење и са вредностима важећим за нетретирану плазму
3. утврдити да ли плазма третирана поступком НИ задовољава критеријуме предвиђене упутствима и правилницима за контролу квалитета.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

На основу досадашњих сазнања о процедурама третирања хемопродуката ради редукције и/или инактивације патогена и Ле – претпоставља се да би поступак НИ плазме системом Мирасол-ПРТ резултовао очувањем квалитета ЗСП, пре свега очувањем терапијски ефективних концентрација стимулатора и инхибитора коагулације у поређењу са контролом – што би било могуће проценити квантификацијом и поређењем активности тих плазматских конституената у наведеним групама (експериментна и контролна) истраживања. Извођењем процедуре НИ плазме системом Мирасол-ПРТ била би омогућена примена овог ПР/ПИ третмана и за карантинску плазму, третирање великих количина плазме одређене крвне групе која је потребна у датом времену и за одређеног болесника, чиме би било олакшано и обезбеђивање довољних количина инактивисане плазме.

2.7. Метод истраживања

2.7.1. Врста студије

Експериментална студија.

Истраживање ће се обавити коришћењем материјала хуманог порекла и применом поступака *ex vivo* квантификације обележја посматрања, уз процену и функционалне очуваности појединих параметара.

Прикупљање и процесирање

Испитивањем ће бити обухваћена ЗСП припремљена из јединица целе крви (30 јединица за експерименталну и 30 јединица за контролну групу) од небираних здравих давалаца, узраста 18–65 година.

Ексфазија крви биће изведена према упутству произвођача пластичних кеса. Крв у волумену од 450 ± 45 ml прикупљаће се у основну кесу четвороделног система пластичних кеса (Macopharma, Француска), која садржи 63 ml антикоагулантно–конзервишућег раствора CPD, састава: лимунска киселина – 206 mg, натријум цитрат – 1,66 g, натријум дихидрогенфосфат – 140 mg и глукоза – 1,46 g. Према произвођачу, кеса у коју ће се издвојити ЗСП омогућава њено складиштење 3 године на температури од -25°C или нижој. За центрифугирање јединица целе крви биће употребљена центрифуга Jouan Kr4i (Jouan, Француска). Јединице целе крви биће центрифугиране на $3890 \times g$ у трајању од 10 минута. Раздвајање центрифугиране крви на плазму, buffy coat (BC) и концентроване еритроците (CE) ће бити урађено употребом аутоматског апарата за процесирање крви Terumo T-ACE II (Terumo, Јапан).

Из јединица плазме које чине контролну групу, узорци (10 ml) ће се узети одмах после сепарације (иницијални узорак-КГ, или аутоконтрола КГ) и после третмана системом Mirasol-PRT (узорак I КГ), у епрувете од инертне пластике без додатих прокоагулантних или антикоагулантних агенаса. Пре лабораторијског испитивања узорци ће бити на собној температури током трајања процеса илуминације. Инактивисане јединице плазме ће бити замрзнуте брзим замрзавњем на -60°C и складиштене на -38°C до периода одмрзавања и тестирања (узорак II КГ).

Јединице плазме које чине експерименталну групу биће тестиране (из 10 ml узорка) одмах после сепарације из јединице целе крви (иницијални узорак ЕГ или аутоконтрола ЕГ) и одмах замрзнуте брзим замрзавњем на -60°C а затим складиштене на -38°C до периода одмрзавања. Након два месеца, плазму ћемо одмрзнути, биће узет узорак (узорак I ЕГ), а затим ће јединице ЗСП бити третиране системом Mirasol-PRT, после чега ће бити узет још један узорак (узорак II ЕГ). Узорак I ЕГ биће на собној температури током времена илуминације, а затим ће узорци бити тестирани на испитиване параметре.

Сам поступак инактивације биће изведен стандардним протоколом система Mirasol-PRT. Најпре, ће свакој јединици ЗСП бити додато по 35 ml раствора рибофлавина ($500 \mu\text{mol/l}$ у физиолошком раствору) у оригиналној кеси за озрачивање (Mirasol ZSP Illumination Bag), како би се постигла финална концентрација рибофлавина од $65\text{--}70 \mu\text{mol/l}$. Раствор рибофлавина као и кеса са ЗСП су спојени са кесом за озрачивање преко апарата за стерилну конекцију TSCD (Terumo, Јапан). Потом се кеса ставља у апарат Mirasol-PRT према упутству произвођача и подвргне деловању UV зрака ($6,24 \text{ J/ml}$, $265\text{--}370 \text{ nm}$) у просечном трајању од 6 минута (9). Након завршетка процеса илуминације ЗСП ће бити пребачена у фабрички спојену кесу за складиштење ЗСП.

Конечно, резултати за различите конституенте плазме биће упоређени и то иницијални са II узорком у оквиру сваке групе (иницијални узорак КГ: узорак II КГ, односно, иницијални узорак ЕГ: узорак II ЕГ) и коресподентни узорци између две групе (иницијални узорак КГ: иницијални узорак ЕГ, односно, узорак II КГ: узорак II ЕГ).

Испитивање конституената плазме

Коришћењем мулти-лабораторијске технике и опреме, биће одређени различити параметри квалитета плазме:

- биохемијски параметри, уреа, креатинин (Cr), укупни билирубин (TB), триглицериди (Tgl), холестерол (Chol), калијум (K), натријум (Na), гвожђе (Fe), аспарат-аминотрансфераза (AST), аланин-аминотрансфераза (ALT), гама глутамил-транспептидаза (GGT), лактат-дехидрогеназа (LDH) и осмотски притисак (Osm-P), ће се одређивати на апарату Advia 1800 Clinical Chemistry System фирме Siemens;

- имуноглобулини IgM, IgG и IgA, као и ниво компонената комплемента C3 и C4 одређиваће се на BNA II нефелометријском анализатору (Siemens), а

- CH50 активност на BCS-XP анализатору фирме Siemens;

- прокоагулантни (FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX) и инхибиторни (antithrombin-III (AT-III) и protein C (PC)) фактори биће одређени на BCS XP Coagulation sistem (Siemens).

2.7.2. Снага студије и величина узорка

Дизајн студије предвиђа постојање две основне групе (контролна и експериментална) у којима ће током 3 поновљена мерења бити утврђене вредности битних параметара ЗСП. Циљ истраживања је да покаже да између две технолошке процедуре (група) не постоје статистички значајне разлике у вредности праћених параметара, посебно фактора VIII (FVIII).

Комплетни подаци добијени су обрадом 30 узорака крви за сваку групу.

Прелиминарни подаци указују да се између група може регистровати разлика средњих вредности од максимално 5%, уз стандардну девијацију од око 10%.

За процену снаге студије коришћен је модел ANOVA за поновљена мерења (међусобна корелација поновљених мерења $p = 0,5$), уз помоћ комерцијалног софтвера GPower 3.1.

Уз вероватноћу грешке првог типа ($\alpha = 0,05$), израчуната снага студије означи 0,7991 односно $\approx 80,0\%$.

2.7.3. Статистичка анализа

Добијени резултати ће бити приказани као средње вредности, уз стандардну девијацију. Они ће бити упоређени коришћењем одговарајућих статистичких метода. Разлике ће се сматрати статистички значајним ако је вредност $p < 0,05$.

2.8. Очекивани резултати и значај студије

На основу података из литературе и познатих података о утицају замрзавања на конституенте плазме, очекујемо да неће бити статистички значајне разлике у испитиваним параметрима плазме између контролне, одмах третиране па замрзнуте и експерименталне, прво замрзнуте па накнадно одмрзнуте и третиране, групе. Очекујемо да пад про- и антикоагулантних фактора, који је доказан после третмана системом Mirasol-PRT у експерименталној групи не буде статистички значајно различит у односу на контролну групу и да остане у границама постављеним захтевима контроле квалитета.

2.9. Оквирни садржај дисертације

Резултати који ће бити добијени у овом истраживању омогућиће увођење и усавршавање сопственог протокола за инактивацију јединица за ЗСП, што ће створити услове за третирање оних количина плазме одређене крвне групе која је потребна у датом времену и за одређеног болесника.

3. Предлог ментора.

За ментора се предлаже Проф. др Душан Вучетић, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије, Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Трансфузиологија.

Предложени наставник испуњава услове за ментора докторске дисертације, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1. Компетентност ментора

1. Živanović S, Rackov LP, Vojvodić D, **Vučetić D**. Human cartilage glycoprotein 39-biomarker of joint damage in knee osteoarthritis. *Int Orthop*. 2009 Aug; 33(4): 1165-70.
2. Jadranin Ž, Šuljagić V, Todorović V, Trkuljić M, **Vučetić D**. HIV/AIDS and other sexually transmitted infections among military members of the Armed Forces of Serbia. *Vojnosanit Pregl* 2012; 69(1): 43-48.
3. Balint B, **Vučetić D**, Todorović M, Borovčanin N, Jovanović-Čupić S, Mandušić V. Safety improving by complementary serological and molecular testing combined with pathogen reduction of the donated blood in window period. *Transf Apher Sci* 2013, 49(1): 103-104.
4. Stojković A, Maslovarić I, Kosanović D, **Vučetić D**. Pertussis vaccine-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Translational Neuroscience*, 2014; 5(1): 57-63.
5. Balint B, Todorovic-Balint M, Petakov M, Ostojic G, **Vučetić D**. Effectively "cross-bridged" hemostatic and blood screening test defects due to glycosylation type 1 associated extremely hyperlipidemia. *Transfus Apher Sci*. 2014; 50(2): 314-5.
6. Balint B, Stepic N, Todorovic M, Zolotarevski L, Ostojic G, **Vučetić D**, Pavlovic M. Ibuprofen induced extensive toxic epidermal necrolysis - single center experience with multidisciplinary therapeutic approach. *Blood Transfusion* 2014; 12(3): 438-9.
7. Balint B, Vučić M, Todorović M, Antić A, Stanojković Z, Vučić J, Pavlović M, **Vučetić D**. Radically reduced ex vivo cell activation by using "in-line" filtered whole blood as a source of platelet concentrate. *Blood Transfusion* 2014; 12(3): 440-2.
8. **Vučetić D**, Kecman G, Ilić V, Balint B. Blood donors' positivity for transfusion-transmissible infections: the Serbian Military Medical Academy experience. *Blood Transfusion* 2015; 13(4): 569-75.
9. Gojkov-Jovičić D, Todorovic-Balint M, Kanjuh V, **Vučetić D**, Pavlovic M, Balint B. Extended platelet concentrate storage/practice - A model based on the rationalized microbial monitoring. *Transfus Apher Sci*. 2015; 53(1): 82-4.
10. Bukara K, Drvenica I, Ilić V, Stančić A, Mišić D, Vasić B, Gajić R, **Vučetić D**, Kiekens F, Bugarski B. Comparative studies on osmosis based encapsulation of sodium diclofenac in porcine and outdated human erythrocyte ghosts. *J Biotechnol*. 2016 Dec 20;240:14-22

11. **Vučetić D**, Ilić V, Vojvodić D, Subota V, Todorović M, Balint B. Flow cytometry analysis of platelet populations: usefulness for monitoring the storage lesion in pooled buffy-coat platelet concentrates. **Blood Transfus.** 2018 Jan;16(1):83-92.
12. Prodović T, Ristić B, **Vučetić D**, Ignjatović-Ristić D. The impact of gender differences on mortality in elderly patients after hip fracture. **Vojnosanit Pregl** 2018; 75(9): 918-25.
13. **Vučetić D**, Jovičić M, Maslovarić I, Bogdanović S, Antić A, Stanojković Z, Filimonović G, Ilić V. Transfusion-transmissible infections among Serbian blood donors: declining trends over the period 2005-2017. **Blood Transfus** DOI 10.2450/2019.0185-18, **Published online:19/02/2019.**

4. Научна област дисертације:

Медицина. Изборно подручје: Имунологија, инфекција и инфламација

5. Научна област чланова комисије

1. Проф. др Небојша Н. Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник;
2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан;
3. Проф. Др Бела Балинт, дописни члан САНУ, научни саветник, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Трансфузиологија и експериментална хематологија, члан.

Закључак и предлог комисије

1. На основу увида у резултате досадашње научно-истраживачке активности и публикованих радова др Драгане Гојков, комисија закључује да кандидат испуњава све услове да приступи изради докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Ради се о оригиналном научном делу које има за циљ да испита улогу утицаја термина инактивације патогена применом рибофлавина и ултравиолетног озрачења на интегритет конситуената плазме у замрзнутој свежој плазми.
3. Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати пријаву докторске дисертације кандидата др Драгане Гојков под називом „Утицај термина инактивације патогена применом рибофлавина и ултравиолетног озрачења на интегритет конситуената плазме у замрзнутој свежој плазми“ и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Проф. др Небојша Н. Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник

2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан

3. Проф. Др Бела Балинт, дописни члан САНУ, научни саветник, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Трансфузиологија и експериментална хематологија, члан.

