



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Драгана Гојков

**УТИЦАЈ ТЕРМИНА ИНАКТИВАЦИЈЕ ПАТОГЕНА
ПРИМЕНОМ РИБОФЛАВИНА И
УЛТРАВИОЛЕТНОГ ОЗРАЧЕЊА НА
ИНТЕГРИТЕТ КОНСТИТУЕНАТА ПЛАЗМЕ У
ЗАМРЗНУТОЈ СВЕЖОЈ ПЛАЗМИ**

докторска дисертација

Крагујевац, 2021.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Dragana Gojkov

**UTICAJ TERMINA INAKTIVACIJE PATOGENA
PRIMENOM RIBOFLAVINA I ULTRAVIOLETNOG
OZRAČENJA NA INTEGRITET KONSTITUENATA
PLAZME U ZAMRZNUTOJ SVEŽOJ PLAZMI**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2021.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Dragana Gojkov

**INFLUENCE OF TIME OF PATHOGEN
INACTIVATION WITH RIBOFLAVIN AND UV-
LIGHT ON PLASMA PROTEINS IN FRESH FROZEN
PLASMA**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021

Аутор
Име и презиме: Драгана Гојков
Датум и место рођења: 23. јул 1967. Нови Сад
Садашње запослење: Институт за трансфузиологију и хемобиологију ВМА, Црнотравска 17, Београд
Докторска дисертација
Наслов: Утицај термина инактивације патогена применом рибофлавина и ултравиолетног озрачења на интегритет конституената плазме у замрзнутој свежој плазми
Број страница: 79
Број графикона: 31; табела: 1
Број библиографских података: 106
Установа и место где је рад израђен: Институт за трансфузиологију и хемобиологију ВМА, Црнотравска 17, Београд
Научна област (УДК): Медицинске науке
Ментор: Проф. др Душан Вучетић
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 23.07.2020.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-918/18 од 10. децембра 2020. године
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: Проф. др Небојша Н. Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник; 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.
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: 1.Проф. др Небојша Н. Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник; 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; 3.Проф. др данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Имунологија, члан.
Датум одбране дисертације:

Autor
Ime i prezime: Dragana Gojkov
Datum i mesto rođenja: 23. jul 1967, Novi Sad
Sadašnje zaposlenje: Institut za transfuziologiju i hemobiologiju VMA, Crnotravska 17, Beograd
Doktorska disertacija
Naslov: Uticaj termina inaktivacije patogena primenom riboflavina i ultravioletnog ozračenja na integritet konstituenta plazme u zamrznutoj svežoj plazmi
Broj stranica: 79
Broj grafikona: 31; tabela: 1
Broj bibliografskih podataka: 106
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Institut za transfuziologiju i hemobiologiju VMA, Crnotravska 17, Beograd
Naučna oblast (UDK): Medicinske nauke
Mentor: Prof. dr Dušan Vučetić
Oцена i odbrana
Datum prijave temed: 23. 07. 2020.
Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije: IV-03-918/18 od 10. decembra 2020. godine
Komisija za ocenu podobnosti teme i kandidata: Prof. dr Nebojša N. Arsenijević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu za uže naučne oblasti Mikrobiologija i imunologija; Onkologija, predsednik; Prof. dr Danilo Vojvodić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu za užu naučnu oblast Imunologija, član; 3. Prof. dr Bela Balint, dopisni član SANU, naučni savetnik, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu za užu naučnu oblast Transfuziologija i eksperimentalna hematologija, član.
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije: Prof. dr Nebojša N. Arsenijević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu za uže naučne oblasti Mikrobiologija i imunologija; Onkologija, predsednik; Prof. dr Danilo Vojvodić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu za užu naučnu oblast Imunologija, član; 3. Prof. dr Bela Balint, dopisni član SANU, naučni savetnik, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu za užu naučnu oblast Transfuziologija i eksperimentalna hematologija, član.
Datum odbrane disertacije:

Author
Name and surname: Dragana Gojkov
Date and place of birth: 23. jul 1967, Novi Sad
Current employment: Institut za transfuziologiju i hemobiologiju VMA, Crnotravska 17, Beograd
Doctoral Disertation
Title: Uticaj termina inaktivacije patogena primenom riboflavina i ultravioletnog ozračenja na integritet konstituenata plazme u zamrznutoj svežoj plazmi
No. of pages: 79
No. of diagrams: 31; Tables: 1
No. of bibliographic data: 106
Institution and place of work: Institut za transfuziologiju i hemobiologiju VMA, Crnotravska 17, Beograd
Scientific area (UDK): Medical sciences
Mentor: Prof. dr Dušan Vučetić
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 23. 07. 2020.
Decision number and date of acceptance of the doctoral: IV-03-918/18 od 10. December 2020
Commision for evaluation of scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: Prof. dr Nebojša N. Arsenijević, full Professor of the Faculty of Medical sciences, Kragujevac, for the narrower scientific field Microbiology and Imunology; Oncology, president; Prof. dr Danilo Vojvodić, full Professor of the Faculty of Medical sciences of Military medical Academy, of University of defence in Belgrade, for narrower scientific field Imunology, member; 3. Prof. dr Bela Balint, corr. member of SANU, scientific adviser, full Professor of Medical sciences of Military medical Academy, of University of defence in Belgrade, for narrower sientific field Transfusiology and Experimental Haematology, member.
Commission for evaluation and defense of doctoral: Prof. dr Nebojša N. Arsenijević, full Professor of the Faculty of Medical sciences, Kragujevac, for the narrower scientific field Microbiology and Imunology; Oncology, president; Prof. dr Danilo Vojvodić, full Professor of the Faculty of Medical sciences of Military medical Academy, of University of defence in Belgrade, for narrower scientific field Imunology, member; 3. Prof. dr Bela Balint, corr. member of SANU, scientific adviser, full Professor of Medical sciences of Military medical Academy, of University of defence in Belgrade, for narrower sientific field Transfusiology and Experimental Haematology, member.
Date of Dissertation Defense:

САЖЕТАК.

Третман замрзнуте свежје плазме (ЗСП) рибофлавином и ултравиолетним (UV) зрачењем инхибира репликацију нуклеинских киселина патогена и леукоцита (Le). Систем за редукацију патогена Мирасол (Mirasol-PRT) се, за разлику од осталих система за инактивацију патогена који се углавном примењују код пулиране плазме, користи за инактивацију појединачних јединица ЗСП и тромбоцита, које су после тога спремне за непосредну клиничку употребу. У овој студији је упоређен ефекат Mirasol-PRT система на садржај протеина у 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. Јединице плазме издвојене из целе крви центрифугирањем су: а) инактивисане и замрзнуте - претходна инактивација [ПИ] или контролна група и б) одмах замрзнуте, а после одређеног времена, одмрзнуте и инактивисане - накнадна инактивација [НИ] или експериментална група. Инактивација је урађена Mirasol-PRT системом. Коришћењем одговарајућих лабораторијских техника и адекватне опреме испитивани су следећи биохемијски параметри: уреа, креатинин (Cr), укупни билирубин (TB), триглицериди (Tgl), холестерол (Chol), калијум (K), натријум (Na), гвожђе (Fe), аспартат-аминотрансфераза (AST), аланин-аминотрансфераза (ALT), гама глутамил-транспептидаза (GGT), лактат-дехидрогеназа (LDH), осмотски притисак (Osm-P), укупни протеини (укупни) и албумини, имунски параметри (IgM, IgG, IgA и компоненте комплемента C3 и C4, уз активност CH50) и прокоагулантни (FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX) и инхибиторни (AT-III, протеин C (PC), протеин S (PS) и α 2-антиплазмин (α 2-AP)) фактори хемостазе. Наши резултати показују да нема значајне промене у финалним концентрацијама биохемијских параметара – протеина, имуноглобулина и осталих конституената у обема групама. Очекивано снижење нивоа фактора коагулације присутно је у обе групе, како је то већ показано у другим радовима. Најзад, утврђен је добар опоравак инхибитора коагулације без значајнијих разлика између група осим за AT-III који има бољи опоравак у експерименталној групи. Овим смо показали да накнадна инактивација ЗСП, према потребама пацијената, дакле одговарајућих крвних група, није инфериорна у односу на класичан начин претходне инактивације која подразумева насумично изабране јединице. Овакав протокол би значајно смањео трошкове примене релативно скупе технологије, јер би се ЗСП инактивисала циљано, за конкретног болесника, а не насумично. Такође би се избегла могућност одбацивања претходно инактивисаних јединица плазме у случају да на тестирању буду позитивне на маркере трансфузијом преносивих инфекција.

Кључне речи: инактивација патогена, рибофлавин, UV зрачење, протеини плазме, замрзнута свежа плазма.

ABSTRACT

Treatment of frozen fresh plasma (FFP) with riboflavin and ultraviolet (UV) radiation inhibits the replication of nucleic acids of pathogens and leukocytes (Le). The Mirasol Pathogen Reduction System (Mirasol-PRT), unlike other pathogen inactivation systems mainly used in pooled plasma, is used to inactivate individual FFP units and platelets, which are then ready for immediate clinical use. This study compared the effect of the Mirasol-PRT system on the protein content in FFP if it is "inactivated" immediately after separation from the whole blood unit, and before storage and if it is treated after storage in a frozen state, ie. after thawing, and immediately before application. Plasma units separated from whole blood by centrifugation are: a) inactivated and frozen - previous inactivation [PI] or control group and b) immediately frozen, and after a certain time, thawed and inactivated - subsequent inactivation [SI] or experimental group. Inactivation was performed with Mirasol-PRT system. The following biochemical parameters were tested using appropriate laboratory techniques and adequate equipment: urea, creatinine (Cr), total bilirubin (TB), triglycerides (Tgl), cholesterol (Chol), potassium (K), sodium (Na), iron (Fe), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transpeptidase (GGT), lactate dehydrogenase (LDH), osmotic pressure (Osm-P), total proteins and albumins, immune parameters (IgM, IgG, IgA) and complement components C3 and C4, with CH50 activity and procoagulant (FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX) and anticoagulant (antithrombin III (AT-III), protein C (PC), protein S (PS) и α 2-antiplasmin (α 2-AP)) factors. Our results show that there is no significant change in the final concentrations of biochemical parameters - proteins, immunoglobulins and other constituents in both groups. The expected decrease in coagulation factor levels is present in both groups, as already shown in other papers. Finally, good recovery of natural inhibitors was found without significant differences between groups except for AT-III which recovery is better in experimental group. We have thus shown that the subsequent inactivation of FFP, according to the needs of patients, ie the appropriate blood groups, is not inferior to the classical method of previous inactivation, which involves randomly selected units. Such a protocol would significantly reduce the cost of use of relatively expensive technology because the FFP would be inactivated targeted, for a specific patient, not randomly. It would also avoid the possibility of rejecting previously inactivated plasma units in case they are positive for markers of transfusion transmitted infections.

Keywords: pathogen inactivation, Riboflavin, UV light, plasma proteins, fresh frozen plasma.

ЗАХВАЛНИЦА

Захваљујем се Професору Арсенијевићу и Професору Војводићу што су учинили да откријем, за мене неслућене, лепоте Имунологије, професору Балинту што ми је омогућио да започнем докторат, а професору Вучетићу да га завршим.

Захваљујем се свом брату, Жарку Кеврешан на несебичној помоћи током целог процеса.

САДРЖАЈ

ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

САЖЕТАК

ABSTRACT

ЗАХВАЛНИЦА

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1 Плазма	1
1.1.1. Клиничка примена плазме	1
1.1.2. Примена реконвалесцентне плазме	1
1.1.3. Плазма као извор хемопродуката/производа фракционисања	2
1.1.4. Неоправдана употреба плазме	2
1.2. Испитивање донација добровољних давалаца крви на маркере трансфузијом преносивих инфекција (Transfusion-transmitted infections (TTI))	2
1.2.1. Вирус хепатитиса В	3
1.2.2. Вирус хепатитиса С	3
1.2.3. Вирус хумане имунодефицијенције (HIV)	4
1.2.4. Сифилис	4
1.2.5. West Nile Virus (WNV)	4
1.2.6. Други, познати агенси	4
1.3. Инактивација/редукција патогена (PI/PR)	5
1.3.1. Врсте инактивације патогена за појединачне јединице ЗСП	5
1.3.1.1. „Methylene blue“ ЗСП (TERAFLEX system)	5
1.3.1.2. Амотосален ЗСП (INTERCEPT system)	6
1.3.1.3. Рибофлавин ЗСП (MIRASOL PRT system)	6
1.3.2. Нежељени ефекти PI/PR технологија	8
2. ЦИЉ РАДА	10
ХИПОТЕЗА	11
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	12
3.1. Прикупљање крви	12
3.2. Процесирање крви и издвајање ЗСП	12
3.3. Поступак са контролном групом	12
3.4. Поступак са експерименталном групом	12
3.5. Поступак инактивације ЗСП	13
3.6. Испитивање конституената плазме	13
3.7. Снага студије и величина узорка	13
3.8. Статистичка анализа	14
4. РЕЗУЛТАТИ	15
4.1. Биохемијски параметри	15
4.1.1. Уреа	16
4.1.2. Креатинин (Cr)	17
4.1.3. Укупни билирубин (ТВ)	18
4.1.4. Триглицериди (Tr)	19
4.1.5. Холестерол (Chol)	20
4.1.6. Калијум (К)	21
4.1.7. Натријум (Na)	22
4.1.8. Гвожђе (Fe)	23
4.1.9. Аспартат трансaminaза (AST)	24
4.1.10. Аланин аминотрансфераза (ALT)	25

4.1.11. Гама-глутамил трансфераза (GGT)	26
4.1.12. Лактат дехидрогеназа (LDH)	27
4.1.13. Осмотски притисак (Osm-Pr)	28
4.3.14. Протеини, укупни	29
4.3.15. Албумин	30
4.2. Прокоагулантни и антикоагулантни фактори хемостазе	30
4.2.1. Фактор II (протромбин)	31
4.2.2. Фактор V	32
4.2.3. Фактор VII	33
4.2.4. Фактор VIII	34
4.2.5. Фактор IX	35
4.2.6. Фактор X	36
4.2.7. Антитромбин III (AT-III)	37
4.2.8. Протеин C (PC)	38
4.2.9. Протеин S (PS)	39
4.2.10. Алфа2- антиплазмин (α 2-AP)	40
4.3. Имуни фактори	41
4.3.1. Имуноглобулин G (IgG)	42
4.3.2. Имуноглобулин A (IgA)	43
4.3.3. Имуноглобулин M (IgM)	44
4.3.4. Укупна активност комплемента CH50	45
4.3.5. C3 компонента комплемента	46
4.3.6. C4 компонента комплемента	47
5. ДИСКУСИЈА	48
5.1. Утицај накнадне инактивације на протеине и биохемијске параметре	50
5.2. Утицај накнадне инактивације на имуноглобулине	50
5.3. Утицај накнадне инактивације на факторе коагулације и природне инхибиторе	51
5.3.1. Фактор II	51
5.3.2. Фактор V	51
5.3.3. Фактор VII	52
5.3.4. Фактор VIII	52
5.3.5. Фактор IX	52
5.3.6. Фактор X	52
5.3.7. AT-III	54
5.3.8. Протеин C	54
5.3.9. Протеин S	54
5.3.10. α 2-AP	54
6. ЗАКЉУЧЦИ	57
7. ЛИТЕРАТУРА	58
8. БИОГРАФИЈА	64

1. УВОД

1.1 Плазма

Плазма је течни део крви који се из целе крви издваја након центрифугирања или поступком аферезе. У воденој фази растворене су различите соли, нутријенти (угљени хидрати, липиди, аминокиселине и други), отпадни продукти метаболизма, пептиди, ензими, хормони и више од 1000 различитих протеина. Најзначајнији од њих су фактори коагулације и природни инхибитори, албумини и имуноглобулини и различити биолошки медијатори (1). Постоје различити препарати плазме који се примењују у трансфузиологији: замрзнута свежа плазма (ЗСП), када се плазма замрзава најкасније 8 сати од прикупљања крви; плазма 24, када се замрзава током 24 сата од узимања, одмрзнута плазма, течна плазма и тзв. „solvent/detergent“ (SD) плазма. ЗСП и плазма 24 садрже све факторе коагулације. Када се ЗСП и плазма 24 одмрзну, постају одмрзнута плазма и могу се складиштити током пет дана на температури од 4°C (1, 2, 3).

1.1.1. Клиничка примена плазме

ЗСП и плазма 24 се користе преоперативно или код крварећих пацијената, за надокнаду више фактора коагулације чији се недостатак најчешће виђа код болести јетре, трансплантације јетре и дисеминоване интраваскуларне коагулације (DIC) - потрошне коагулопатије изазване малигнитетом, инфекцијом, траумом или компликацијом трудноће. Такође се користи за надокнаду фактора коагулације код урођених и стечених коагулопатија када специфични фактор коагулације није доступан.

Користе се код масивне трансфузије обично у односу еритроцити:ЗСП 1:1 због дилуционог ефекта масивне трансфузије (4).

Још једна индикација за примену ЗСП је корекција предозирања warfarin-ом или другим витамин К антагонистима.

ЗСП или ЗСП сиромашна у криопреципитату се користи за измену плазме и надокнаду код тромботске тромбоцитопенијске пурпуре (ТТР) где се изменом плазме отклањају аутоантитела, а надокнадом обезбеђује извор металопротеиназе која цепа веома велике молекуле WVF, ADAMTS13.

Коначно, ЗСП се даје као надокнада код ретких стања недостатка специфичних плазма протеина (1,2,3).

1.1.2. Примена реконвалесцентне плазме

Реконвалесцентна плазма је плазма давалаца који су прележали неку акутну вирусну болест и створили неутралишућа антитела на вирус изазивач те болести. Коришћена је код разних болести као што су: мале богиње, Human influenza A (H1N1) у 2009. години, Ебола 2014. године, Severe acute respiratory syndrome (SARS) и Middle East respiratory syndrome (MERS) 2015. године, avian influenza A (H5N1) 2019. године. Тренутно је та примена интензивирана у борби против актуелне пандемије SARS-CoV-2 вируса, тј. лечењу болесника са COVID-19 (1,5). Наиме, с обзиром на недостатак специфичних превентивних и терапијских могућности, реконвалесцентна плазма је од изузетног значаја као прва линија одбране (6). Међутим, даваоци реконвалесцентне плазме често пре тога нису донирали крв и

њихове донације се могу сматрати потенцијално ризичним. С обзиром да су примаоци плазме нарочито вулнерабилна група, примена PRT на овакву плазму и широк спектар патогена који се на тај начин инактивише, чинио би овај хемопродукт значајно сигурнијим (7).

1.1.3. Плазма као извор хемопродуката/производа фракционисања

Када се ЗСП одмрзне на температури од 2-6°C долази до преципитације на хладном-нерастворљивих протеина. Центрифугирањем се ови протеини одвајају од течног дела и након отклањања вишка одмрзнуте плазме, добија нови продукт тзв. криопреципитат. Званичан назив, криопреципитирани антихемофилни фактор већ упућује на његов састав и намену. Наиме, криопреципитат садржи фибриноген, фактор VIII, фактор XIII, von Willebrand фактор и фибронектин. До увођења у употребу рекомбинантних фактора коагулације, коришћен је у терапији хемофилије А (8, 9), FXIII дефицијенције, хипофибриногемије и von Willebrand-ове болести. С обзиром да је употреба концентрованог фибриногена и протромбинског комплекса на рачун РФЗО дозвољена код малог броја индикација, употреба криопреципитата као извора фибриногена се среће код стечених фибриногемија чији узрок могу бити: масиван губитак крви код траума, компликација крварења у гинекологији, трансплантацији јетре и DIC-а. Уместо prothrombin complex concentrate - PCC, користи се код трауматског крварења (као извор витамин К-зависних фактора коагулације), заједно са ЗСП.

Даљом концентрацијом криопреципитата, добија се фибрински лепак (10).

Сложеним процесом манипулације из пула плазме од многобројних давалаца добија се продукт имуноглобулини. Најчешће су то интравенски имуноглобулини (енгл. intravenous immunoglobulin, IVIG) али постоји и субкутани, нормални хумани и хиперимуни имуноглобулини. Могу се користити као надокнадна терапија код примарне и секундарне имунодефицијенције, као специфична терапија (хиперимуни серум) код одређених патогена као што су беснило, хепатитис Б, тетанус, Rh(D) имуноглобулин, и код различитих аутоимунних болести.

Из плазме се, такође процесом фракционисања, добијају: албумини, фибриноген, фактори коагулације VIII и IX, протромбински комплекс, фактор VII, фактори XI и XIII, антитромбин-3 (AT-III), протеин C, C1 естераза инхибитор, α 1-Antitrypsin (1, 11).

1.1.4. Неоправдана употреба плазме

Иако је иницијално плазма коришћена за надокнаду волумена, данас (с обзиром на плазма експандере и пречишћени албумин) таква употреба није оправдана али је, још увек широко заступљена. Плазму не би требало користити ни за корекцију хипопротеинемије, корекцију имунодефицијенције или у нутритивне сврхе јер за ове индикације постоје пречишћени концентровани препарати. Такође није оправдана употреба плазме у корекцији урођене или стечене дефицијенције фактора коагулације ако нема крварења (12,13).

1.2. Испитивање донација добровољних давалаца крви на маркере трансфузијом преносивих инфекција (Transfusion-transmitted infections (TTI))

С обзиром да се крвљу могу пренети узрочници многобројних болести, свака јединица дониране крви се по Закону у Републици Србији испитује на присуство

вируса хепатитиса В, С, HIV-а (Human immunodeficiency virus) и луеса, тј. *Treponema-pallidum* (присуства антитела на ову спирохету). Испитивање се ради серолошким тестовима, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) или CIA (Chemiluminescence Assays) који су сукцесивно увођени у трансфузиолошку праксу, а Према Закону о трансфузијској медицини од 8.9.2019, обавезан је и PCR (polymerase chain reaction) тест на HBV, HCV и HIV (Закон о трансфузијској медицини, „Сл. Гласник РС“, бр.40/2017 и 113/2017).

1.2.1. Вирус хепатитиса В

Вирус хепатитиса В (HBV) је идентификован 1963. године код аустралијских староседелаца- Аборицина због чега је назван „аустралијски антиген“ (14). Већ тада је уочена висока преваленца овог вируса код мултитрансфундованих болесника. HBV припада фамилији *Hepadnaviridae* и састоји од спољашњег липидног омотача и двадесетостраничног нуклеокапсидног једра. У нуклеокапсиду се налази вирусна DNA и DNA polymerase-а са активношћу реверзне транскриптазе. Спољашњи омотач садржи протеине који учествују у везивању за, и улазак у осетљиве ћелије – хепатоците (15). У серуму инфицираних особа могу се наћи и филаментозна и сферична тела којима недостаје једро. Она нису заразна, а састоје се од липида и протеина који граде делове површине вируса. Називају се површински антигени (Hepatitis B surface Antigen - HBsAg) и стварају се у великој количини током животног циклуса вируса (16). Инфекција HBV је веома честа и прорачуни су да је око 5% светске популације (преко 300 милиона људи) носилац овог вируса (17), а преноси се преко крви и сексуалним путем. Између 5 и 10% акутних инфекција прелази у хронично клицоноштво (18). Преваленца HBV у Србији износи: 0,087% и спада у ниже у Европи (19).

За детекцију вируса значајна су три антигена и на њих створена антитела: HBsAg, HBcAg (Hepatitis B core Antigen) и HBeAg (Hepatitis B envelope Antigen).

Серолошко детектовање вируса на HBsAg започето је 1969. године, а у трансфузиолошку праксу је уведено 1971. године (18).

1.2.2. Вирус хепатитиса С

Вирус хепатитиса С је мали, једноланчани RNK вирус са липидним омотачем из породице *Flaviviridae*. Дуго времена је био познат као non-A, non-B (NANB) вирус јер се код великог броја болесника са клиничком сликом хепатитиса није могао доказати ни један од до тада познатих вируса изазивача хепатитиса, тј. ни HBV ни HAV (Hepatitis A Virus). 1989. године вирус је изолован и назван Hepatitis C Virus – HCV (20).

Преваленца варира од 2% у Северној Америци, Европи и Аустралији, до 5% у Африци (21).

Преваленца у Србији износи: 0,064%, што нас сврстава у земље са ниском фреквенцом вируса у Европи (19).

HCV је генетски хетероген вирус са 6 главних генотипова. Антитела анти-HCV (која немају протективну улогу) (22) су присутна код око 70% болесника у тренутку испољавања симптома, а после 6 месеци након експозиције, код свих (23). Преноси се заједничком употребом заражене игле код интравенских зависника, а 1975. је доказано да се преноси и преко крви и продуката од крви. Тест за утврђивање присуства антитела анти-HCV уведен је у трансфузиолошку праксу 1990. године.

1.2.3. Вирус хумане имунодефицијенције (HIV)

Болест коју изазива HIV је описана 1981. године и већ 1982. вирус је препознат као агенс који може да се преноси трансфузијом крви и крвних продуката, док је сам вирус изолован следеће, 1983 године. HIV је RNA вирус из рода *Lentiviridae*, фамилије *Retroviridae* (24). Вирусна честица се састоји од липиднопротеинског омотача око конусне капсуле у којој се налазе две једноланчане RNA. Постоје два типа вируса: HIV-1 (глобално распрострањен, високо вирулентан и високо инфективан) и HIV-2 (западна Африка, нижа вирулентност, ниска инфективност). Налази се, у довољној концентрацији за трансмисију, у крви, сперми, предејакулационој течности, вагиналном секрету и мајчином млеку, те се преноси сексуалним путем, коришћењем заједничких игала код интравенских зависника, преко плаценте, мајчиног млека и трансфузијом крви и крвних продуката (25, 26). После дугог периода инкубације (до 10 година), током којег се вирус умножава и узрокује драстичан пад CD4+ лимфоцита, долази до испољавања болести енгл. *Acquired Immune Deficiency Syndrome – AIDS* коју карактерише немогућност организма да се избори и са најбезазленијим инфекцијама (24, 27-29). Преваленца HIV-а у Србији износи 0,013%, што такође сврстава нашу земљу у групу земаља са ниском преваленцом у Европи (19). Тестови су уведени у трансфузиолошке установе 1985. године; прво само детекција антитела на HIV, а затим и комбиновани тест који детектује и присуство антигена (p24).

1.2.4. Сифилис

Сифилис је полно преносива болест коју изазива спирохета *Treponema pallidum*. Може се пренети и са мајке на дете, конгенитално. У многим високо развијеним земљама тест на сифилис се не ради јер је трансмисија трансфузијом изузетно ретка делом и зато што ова спирохета не може да опстане на ниским температурама на којим се складиште крв и крвни продукти, осим тромбоцита (30). Преваленца сифилиса у Србији износи 0,04% и спада међу ниже у Европи (19)

1.2.5. West Nile Virus (WNV)

Испитивање крви на присуство WNV код нас није обавезно по закону, али је у Институту за трансфузиологију и хемобиологију ВМА увођено повремено сезонско тестирање од маја до октобра. WNV је RNA вирус са омотачем, из фамилије *Flaviviridae*. Откривен је у Уганди 1937. Ендемичан је у Африци, средњем Истоку и деловима Европе (31). Преносе га комарци, првенствено на птице, а понекад и на људе (32, 33). Прва потврђена трансмисија WNV трансфузијом је била 2002. године, мада се сумњало већ 1999. године, а тест је у САД уведен 2003. године (35). Поред крви и продуката од крви, WNV се може пренети и преко трансплантираних органа. Инфекција WNV је у 80% случајева асимптоматска, што олакшава трансмисију преко крви, а код испољене симптоматологије срећу се фебрилне епизоде и неуролошки симптоми (менингоенцефалитис).

1.2.6. Други, познати агенси

Сваки патогени агенс који се може наћи у циркулацији током своје асимптоматске фазе, представља ризик за трансмисију преко крви и крвних продуката. Вероватноћа

трансмисије, свакако зависи од дужине виремије/бактеријемиије/паразитемиије и тежине болести до које доводи. Највећа опасност данас прети од зооноза: маларија, dengue, Chikungunya, Zika, WNV-изазван менингоенцефалитис, бабезиоза (*Babesia microti*), ерлихиоза (*Ehrlichia*), Colorado крпељска грозница, Шагасова болест (*Trypanosoma cruzi*), а вероватно и Лајмска болест (*Borrelia burgdorferi*), висцерална лајшманијаза (*Leishmania*) и flavivirus-ом изазван енцефалитис. Ризик, такође, представљају и human herpesvirus (HHV)-8, узрочник Капошијевог саркома, cytomegalovirus (CMV), parvovirus B-19 (PVB-19), хумани папилома вирус и други (35, 36).

1.3. Инактивација/редукција патогена (PI/PR)

„Инактивација патогена“ и „редукција патогена“ су термини који се равноправно користе у стручној литератури.

Инактивација/редукција патогена представља проактиван приступ у обезбеђивању што сигурније крви и продуката од крви, у погледу инфекција преносивих трансфузијом. Са редукцијом/инактивацијом патогена започето је 1991. године увођењем тзв. „solvent/detergent“ (S/D) методе на пул плазме од великог броја давалаца која се користила за фракционисање. Међутим, нове методе за инактивацију патогена примењиве на појединачне јединице плазме постале су доступне од 2000. године. Технологије инактивације патогена нуде третман против широког спектра потенцијалних патогена (бактерија, вируса и паразита) у крви и крвним производима. Ове технологије циљају и оштећују нуклеинске киселине (DNK и RNK) у патогенима користећи ултраљубичасто (UV) светло. DNK и RNK садрже генетске информације, а њиховим оштећењем, спречава се репродукција патогена. Ово ефикасно уништава способност патогена да изазове болест. Како третман инактивације патогена оштећује све нуклеинске киселине, укључујући и оне у белим крвним зрнцима која се налазе у крвним производима, то може уклонити потребу за додатним третманима крвних производа (нпр. зрачењем) који су потребни за одређене популације пацијената (37-41).

1.3.1. Врсте инактивације патогена за појединачне јединице ЗСП

Све технологије инактивације патогена се заснивају на принципу фотоинактивације у којој комбинација фотосензитишуће хемијске и светлосне енергије доводи до убијања или инактивације патогена. Хемопродукту се додају хетероциклична једињења која имају специфичан афинитет за нуклеинске киселине преко интеракције са базним групама нуклеотида након чега се излажу ултраљубичастој или видљивој светлости што доводи до екситације електрона када једињење може директно да реагује са нуклеинском киселином (фотохемијска реакција) или, пак настаје секундарна активација током које се ослобађају реактивни кисеонични радикали (тип 1) или реактивни кисеоник (тип 2) у фотодинамичкој реакцији. Као последица везивања унутар или између ланаца нуклеинских киселина, долази до инхибиције репликације патогена (42).

1.3.1.1. „Methylene blue“ ЗСП (TERAFLEX system)

„Methylene blue“ (MB), позитивно наелектрисан дериват phenothiazine-a, је на собној температури зелени прах без мириса, растворљив у хладној води. MB се умеће између ланаца нуклеинских киселина, а након излагања видљивој светлости, долази

до његове експитације са једне стране и, услед преноса енергије, стварања високо реактивног кисеоника, са друге стране. Кисеоник оксидира гванозин и на тај начин кида нуклеинске киселине онемогућавајући репликацију патогена.

У оригиналној МВ технологији плазма се прво замрзавала па одмрзавала, што је изазивало распадање леукоцита, а затим је додавана различита количина МВ солуције како би се постигла концентрација од 1 $\mu\text{mol/l}$ у сваком продукту. Каснији системи, развијени за мању количину продукта у трансфузиолошким центрима, укључују стерилну конекцију јединице плазме са паковањем које има филтер за леукодеплецију изнад кесице са 85-95 μg МВ. Да би се постигла потребна концентрација од 1 $\mu\text{mol/l}$ МВ, волумен плазме треба да буде између 200 и 300 ml. Потом се филтрована јединица са додатим МВ излаже видљивој светлости да би се МВ активирао (око 30 минута) и, затим, филтрира како би количина резидуалног МВ била испод 0,1 $\mu\text{mol/l}$, после чега је спремна за складиштење или примену.

МВ инактивише вирусе везујући се за њихове нуклеинске киселине, али има већу ефикасност за вирусе са двоструким ланцем. Такође може да модификује протеине и липиде. Сматра се да није поуздан у инактивацији интраћелијских вируса, бактерија и протозоа мада улази у ћелије. Тако да МВ инактивише само вирусе у плазми због чега је неопходна филтрација (раније замрзавање, одмрзавање да би дошло до лизе ћелија). Инактивише вирусе са омотачем до 5 log-a, док је ефикасност инактивације вируса без омотача хетерогена, а потпуно је неефикасан за вирус хепатитиса А (HAV). Инактивише PVB-19, бактерије и протозое (42, 43).

1.3.1.2. Амотосален ЗСП (INTERCEPT system)

Овај систем као фотосензитишућу супстанцу користи једињење базирано на псоралену- амотосален хидрохлорид. Псоралени као што су 8-methoxypsoralen и trimethylpsoralen, су фотоактивне супстанце широко распрострањене у биљном свету, брзо пролазе кроз ћелијску мембрану, бактеријски зид и вирусни омотач и умећу се у нуклеинске киселине без утицаја на протеине и липиде. Амотосален-HCl се умеће између нуклеинских киселина са своја два реактивна места. Током излагања дуготаласним ултравиолетним зрацима (UVA, 320-400 nm), реверзибилно уметнут Амотосален-HCl реагује са пиримидинским базама и формира сталне, ковалентне везе, унакрсно везујући ланце нуклеинских киселина, онемогућавајући транскрипцију и репликацију. Илуминација ЗСП се изводи са 3 J/cm² у току 3-6 минута. На крају процеса, резидуални Амотосален-HCl и деградациони продукти се отклањају филтрирањем. Инактивише ћелијске као и слободне вирусе са омотачем у плазми, док је инактивација вируса без омотача варијабилна, зависно од вируса. Инактивише бактерије и протозое (42, 43).

1.3.1.3. Рибофлавин ЗСП (MIRASOL PRT system)

MIRASOL PRT систем користи витамин B2 – рибофлавин (RB) и ултраљубичасту (UV) светлост. Рибофлавин је у води растворљив витамин, састојак исхране са познатом фармакокинетиком и токсиколошким профилем, који се брзо излучује и не може се депоновати у организму (44). Он је прекурсор коензима flavin mononucleotide (FMN) и flavin adenin dinucleotide (FAD), главних коензима који учествују у моноелектронском трансферу у организму (45). RB је фотосензитишућа супстанца што омогућава селективно оштећење нуклеинских киселина после излагања UV светлости, без везивања за ћелије или протеине. RB се везује за нуклеинске киселине и посредује у кисеоник-независном трансферу електрона,

доведећи до модификације нуклеинских киселина, првенствено на гванинским резидуама. Фотолитиза РВ доводи до стварања лумихрома (46, 47), 2'-ketoriboflavin-a, 4'-ketoriboflavin-a и formylmethylflavin-a који су нормални метаболити РВ и налазе се у малим концентрацијама у плазми здравих људи што значи да није створена нека нова супстанца РВ/UV техником инактивације (36,43).

У поређењу са применом само UV светлости, која изазива реверзибилна оштећења нуклеинских киселина, оштећења изазвана РВ су иреверзибилна јер су репликација и репарација онемогућени услед модификације гванинских база (36). Техника РВ/UV се већ дуго користи као стандардна фототерапија новорођенчади са неонаталном жутицом без пријављених проблема (48).

Очигледна предност ове методе је чињеница да није потребно отклањати вишак рибофлавина јер је РВ природна супстанца без познате токсичности у датим концентрацијама (49).

Ефикасно инактивише бактерије, протозое, леукоците и вирусе, првенствено са омотачем али у знатној мери и оне без омотача.

Степен редукције вируса: HIV (са омотачем), латентни: 4.5 log, HIV (са омотачем), активни: 5.9 log, West Nile virus (са омотачем) ≥ 5.1 log, Hepatitis C virus (са омотачем) 3.2 log/ml, Hepatitis B virus (са омотачем): 2.5 log/ml, Rabies virus (са омотачем) ≥ 6.3 log/ml, Influenza virus (са омотачем) ≥ 5.0 log/ml, Cytomegalovirus (са омотачем): 2.1 log/ml, Human B19 virus (без омотача) ≥ 5.0 log/ml, Hepatitis A virus (без омотача): 1.8 – 3.2 log/ml, Chikungunya virus (са омотачем): 2.1 log/ml (36), Ebola virus ≥ 3.0 log-a (50, 51).

Степен редукције бактерија: Leishmania donovani ≥ 4.0 log/ml, Plasmodium falciparum ≥ 3.2 log/ml, Trypanosoma cruzi ≥ 5.0 log/ml, Babesia microti ≥ 4.0 log/ml, Orienta tsutsugamushi (Scrub typhus) ≥ 5.0 log/ml (36).

Такође, инактивише бактерије релевантне за трансфузиолошку праксу: грам позитивне Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus mittis, Streptococcus pyogenes, и грам негативне Enterobacter cloacae, Propionibacterium acnes, Serratia marcescens, Klebsiella pneumoniae, Acinobacter baumannii и Yersinia enterocolitica (36, 51, 52).

Упоредни приказ карактеристика три методе инактивације патогена дата је у табели (табела преузета из Cicchetti et al. (43)):

	МВ плазма	A/UVA ЗСП	RB/UV ЗСП
Механизам дејства	МВ се умеће у нуклеинске киселине и посредује у стварању синглет кисеоника по излагању светлости	Амотосален се умеће у нуклеинске киселине и индукује ковалентно унакрсно везивње после излагања UVA светлости	Рибофлавин се везује за нуклеинске киселине и посредује кисеоник-независни пренос електрона при UV зрачењу
Компоненте крви на које се примењује	Плазма	Плазма и тромбоцити	Плазма и тромбоцити
Комерцијални производи	Theraflex МВ, Macopharma	Intercept, Cerus	Mirasol PRT, Terumo
Извор продукта	Плазма из целе крви; аферезна плазма	Аферезна плазма-велика доза; из целе крви-бар две јединице морају бити пулиране заједно	Из целе крви као појединачна доза; аферезна плазма
Рок чувања	2 год. на -30°C	2 год. на $\leq 25^{\circ}\text{C}$; 1 год. - 18 до -25°C	2 год. на -30°C
Време озрачивања	15 минута	3-6 минута за 2 кесе	5-8 минута за 1 кесу
Примарна мета	Нуклеинске киселине	Нуклеинске киселине	Нуклеинске киселине
Токсичност	Ниска	Висока	Нема
Отклањање активне компоненте	Да, специјалним филтерима	Да, абсорпцијом	Не треба
Ниво активне субстанце после отклањања	Врло низак ниво МВ и фотопродуката	Врло низак ниво слободног амотосал. и фотопродуката	Низак ниво RB и фотопродуката нормално присутан у крви
Везивање за протеине и липиде у плазми	Протеини уметнути у фенотиазину сличним бојама	Амотосален се везује за липиде и 2% за протеине	Не везује се

1.3.2. Нежељени ефекти PI/PR технологија

Вредност неке PI/PR методе се дефинише, са једне стране, њеном ефикасношћу и спектром патогена које инактивише, а са друге, клиничком ефикасношћу третираног продукта (53).

Различити патогени агенси су тестирани, како *in vivo* тако и *in vitro* у моделу ћелијске културе. Као што је већ наведено, различите методе инактивације патогена имају различит степен ефикасности према различитим вирусима. Способност неке инактивационе технологије се изражава као редуccionи фактор који представља: однос укупног нивоа вируса (титар \times волумен) пре и после третмана, изражен у логаритамској скали. То значи да, на пример, 6 \log_{10} редуccionи фактор означава способност методе да редукују количину микроба у једном литру који садржи 1000 инфективних јединица (IU) по ml ($1000\text{ml} \times 1000 \text{ IU/ml} = 1000\ 000 \text{ IU}$ укупно) до резидуалне једне јединице (IU) у једном литру продукта (42).

Како се за све крвне донације раде серолошка и молекуларна тестирања, позитивне, тј. јединице са високим титром се одбацују, а слична је ситуација и са бактеријама које се у тренутку донације налазе у врлом малој количини у крви, мањој од 100 бактерија по ml (54).

Различите PI/PR методе, такође, имају различит утицај на количину/функцију протеина у плазми. Количина укупних протеина, углавном, није промењена (55).

Подаци добијени из различитих студија, дакле, под различитим условима и различитим методама, указују да MB метода инактивације смањује функционалну активност фибриногена за 24-39%, FVIII за 13-33%, FIX за 11-23%, FXI за 17-27%, што се клинички манифестује продуженим протромбинским (PT), и активираним парцијалним тромбoplastинским временом (aPTT) (56). Протеин C и S су релативно непромењене активности док је активност VWF смањена за 10-20% (57). Такође, нема значајног пада количине антитела (58).

Амотосален/UVA метода доводи до смањења нивоа фибриногена, FV, FVII, FVIII, и FX за 13% до 33%, а инхибиторни фактори су и овде добро очувани као и активност VWF (59). Такође, не утиче значајно ни на имуноглобулине (58).

RB/UV метода има, као и претходне, учинак на факторе коагулације у смислу њиховог снижења, те је просечан проценат опоравка активности за фибриноген 77%, за FII 80%, FVIII 75%, а FV 73%. Опоравак инхибитора коагулације је знатно бољи - више од 90% (60-64). Количина антитела након RB/UV третмана је нешто мања у односу на претходне методе али у границама референтних вредности (65).

2. ЦИЉ РАДА

Циљ овог рада је увођење и усавршавање сопственог протокола за инактивацију јединица ЗСП, с тим што је главни циљ провера и процена састава и квалитета ЗСП третиране према нашем оригиналном протоколу.

У складу са генералним циљем одређени су и конкретни задаци:

1. квантификовати у узорцима плазме пре и после третмена 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.

ХИПОТЕЗА

На основу досадашњих сазнања о процедурама третирања хемопродуката ради редукције/инактивације патогена и Le – претпоставља се да би поступак НИ плазме системом Mirasol-PRT резултовао очувањем квалитета ЗСП, пре свега очувањем терапијски ефективних концентрација стимулатора и инхибитора коагулације у поређењу са контролом. Ово би било могуће проценити квантификацијом и поређењем активности тих конституената плазме у наведеним групама истраживања. Извођењем процедуре НИ плазме системом Mirasol-PRT била би омогућена примена овог PR/PI третмана и на карантинску плазму, третирање великих количина плазме одређене крвне групе која је потребна у датом времену и за одређеног болесника. Тиме би било олакшано и обезбеђивање довољних количина инактивисане плазме, са једне стране, а са друге би се постигла и значајна економска уштеда јер би се инактивисале само оне неопходне, а не целокупна количина плазме. Такође, избегао би се ризик, односно финансијски трошак, да се инактивише плазма позитивна на неки од маркера ТТГ (резултати су доступни тек наредни дан у односу на време инактивације).

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Прикупљање крви

Испитивањем је 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.

Екскузија крви је изведена према упутству произвођача пластичних кеса. Крв у волумену од 450 ± 45 ml прикупљена је у основну кесу четвороделног система пластичних кеса (Masopharma, 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.

Даваоци су били нереактивни на хепатитис В и С вирус, HIV и Syphilis, што је испитивано хемилуминисцентном методом на апарату Architect i2000 SR (Abbott, САД), као и PCR техником (HBV, HCV и HIV), коришћењем Cobas AmpliPrep и AmpliCor апарата (Roche, Немачка). Такође, даваоци су задовољавали клиничке и лабораторијске налазе потребне за добровољно давање крви и нису имали коагулопатије у анамнези.

3.2. Процесирање крви и издвајање ЗСП

За центрифугирање јединица целе крви употребљена је центрифуга Jouan Kr4i (Jouan, Француска). Јединице целе крви су центрифугиране на $3\ 890 \times g$ у трајању од 10 минута на температури 4°C . Раздвајање центрифугиране крви на плазму, buffy coat (BC) и концентроване еритроците (KE) је урађено употребом аутоматског апарата за процесирање крви Tegimo T-ACE II (Tegimo, Јапан). Према произвођачу, кеса у коју се издваја ЗСП омогућава њено складиштење 3 године на температури од -25°C или нижој.

3.3. Поступак са контролном групом

Из јединица плазме које чине контролну групу, узорци (10 ml) су узети а) одмах после сепарације (иницијални узорак-КГ, или аутоконтрола КГ) и б) после третмана системом Mirasol-PRT (узорак I КГ), у епрувете од инертне пластике без додатих прокоагулантних или антикоагулантних агенаса. Пре лабораторијског испитивања узорци су били на температури од $20 \pm 2^\circ\text{C}$ током трајања процеса илуминације. Инактивисане јединице плазме су биле замрзнуте брзим замрзавањем на -60°C и складиштене на -38°C до периода одмрзавања и тестирања (узорак II КГ).

3.4. Поступак са експерименталном групом

Јединице плазме које чине експерименталну групу су тестиране (из 10 ml узорка) а) одмах после сепарације из јединице целе крви (иницијални узорак ЕГ или аутоконтрола ЕГ) и одмах замрзнуте брзим замрзавањем на -60°C , а затим складиштене на -38°C до периода одмрзавања. Након два месеца, плазма је одмрзнута, б) узет је узорак (узорак I ЕГ), а затим су јединице ЗСП третиране системом Mirasol-PRT, после чега је ц) узет још један узорак (узорак II ЕГ). Узорак I ЕГ био је на температури од $20 \pm 2^\circ\text{C}$ током трајања илуминације, а затим су узорци тестирани на испитиване параметре.

3.5. Поступак инактивације ЗСП

Сам поступак инактивације је изведен стандардним протоколом система Mirasol-PRT (TerumoBCT, САД). Најпре, је свакој јединици ЗСП додато по 35ml раствора рибофлавина (RB) (500 μ mol/l у физиолошком раствору) у оригиналној кеси за озрачивање (Mirasol ZSP Illumination Bag), како би се постигла финална концентрација рибофлавина од 65–70 μ mol/l. Раствор рибофлавина као и кеса са ЗСП су спојени са кесом за озрачивање преко апарата за стерилну конекцију TSCD (Terumo, Јапан), а ваздух присутан у кеси истиснут у кесу за RB. Потом се кеса ставља у апарат Mirasol-PRT према упутству произвођача и подвргне деловању UV зрака (6,24J/ml, 265–370nm, константно хоризонтално мешање 120 покрета/мин.) у просечном трајању од 6 минута зависно од количине продукта (64). Након завршетка процеса илуминације ЗСП је пребачена у фабрички спојену кесу за складиштење ЗСП.

Коначно, 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).

3.6. Испитивање конституената плазме

Коришћењем мулти-лабораторијске технике и опреме, одређени су 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-трансферазе (GGT), лактат-дехидрогеназа (LDH) и осмотски притисак (Osm-P), одређивани су на апарату Advia 1800 Clinical Chemistry System (Siemens, Немачка);
- протеини (укупни), албумини, имуноглобулини IgM, IgG и IgA, као и ниво компонената комплемента C3 и C4 одређивани су на BNA II нефелометријском анализатору (Siemens, Немачка), а
- CH50 активност на BCS-XP анализатору (Siemens, Немачка);
- прокоагулантни (FII, FV, FVII, FVIII, FIX, FX) и инхибиторни (antithrombin-III (AT-III), протеин C (PC), протеин S (PS) и α 2-антиплазмин (α 2-AP)) фактори били су одређени на BCS XP Coagulation sistem (Siemens, Немачка).

3.7. 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 $\rho = 0,5$), уз помоћ комерцијалног софтвера GPower 3.1.

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

3.8. Статистичка анализа

Добијени резултати су приказани као средње вредности, уз стандардну девијацију за сваки испитивани параметар. Статистичка анализа је урађена компарацијом између различитих група коришћењем стандардног Студентовог t-теста за упарене узорке. Разлике су сматране статистички значајним ако је p вредност мања од 0.05 ($p < 0,05$). За статистичку обраду коришћен је софтверски пакет StatSoft, Inc. (2014). STATISTICA (data analysis software system), version 12. www.statsoft.com.

4. РЕЗУЛТАТИ

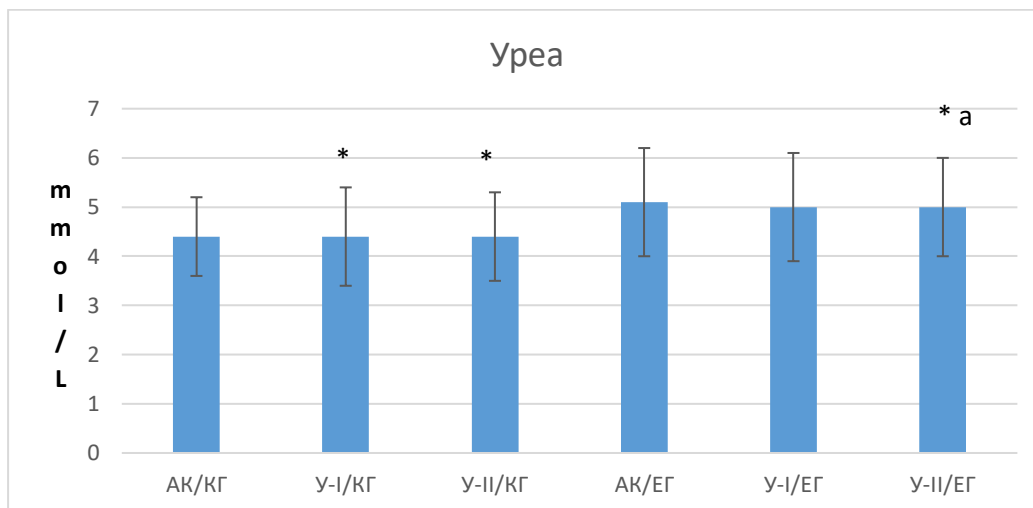
4.1. Биохемијски параметри

Концентрација различитих плазма конституената, које бисмо за наше потребе могли назвати „проширена биохемија“ није од пресудног значаја за терапијску примену плазме али може бити добар показатељ утицаја инактивације RB/UV зрачења на различите протеине.

Такође, иако примена ЗСП као извора албумина више не стоји у препорукама за њену примену, у случају несташице раствора албумина, она се, ипак, користи и из тих разлога.

4.1.1. Уреа

На дијаграму бр. 1 приказане су вредности уреје: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи (претходна инактивација), односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације у експерименталној групи (накнадна инактивација).



Дијаграм бр 1. Концентрација уреје у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/КГ = узорак І (PRT третирани); У-ІІ/КГ = узорак ІІ (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/ЕГ = узорак І (замрзнути/одмрзнути); У-ІІ/ЕГ = узорак ІІ (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

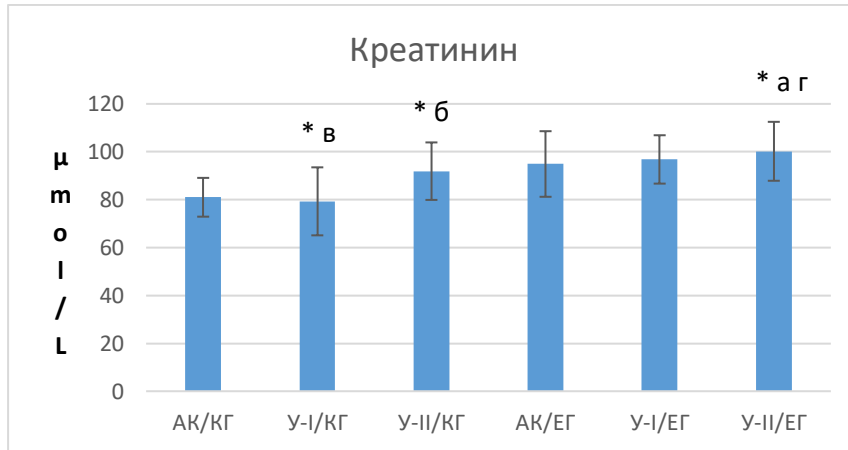
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

a У-ІІ/КГ vs. У-ІІ/ЕГ ($p < 0.05$).

У концентрацији уреје не постоји статистички значајна разлика између аутоконтроле и узорка І како у контролној, тако и у експерименталној групи. Таква разлика не постоји ни између аутоконтроле и узорка ІІ у обе групе, али је концентрација уреје у другом узорку експерименталне групе виша (после замрзавања/одмрзавања, па инактивације) што је статистички значајно ($p < 0.05$) од концентрације уреје у другом узорку контролне групе (инактивација пре замрзавања) што је без клиничког значаја (Дијаграм бр. 1).

4.1.2. Креатинин (Cr)

На дијаграму бр. 2 приказане су вредности креатинина: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања контролне групе, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације у експерименталној групи.



Дијаграм бр. 2. Концентрација креатинина у испитиваним узорцима
Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/КГ = узорак І (PRT третирани); У-ІІ/КГ = узорак ІІ (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).
Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/ЕГ = узорак І (замрзнути/одмрзнути); У-ІІ/ЕГ = узорак ІІ (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

а У-ІІ/КГ vs. У-ІІ/ЕГ ($p < 0.05$).

б АК vs. У-ІІ ($p < 0.05$).

в АК/КГ vs. У-І/КГ ($p < 0.05$).

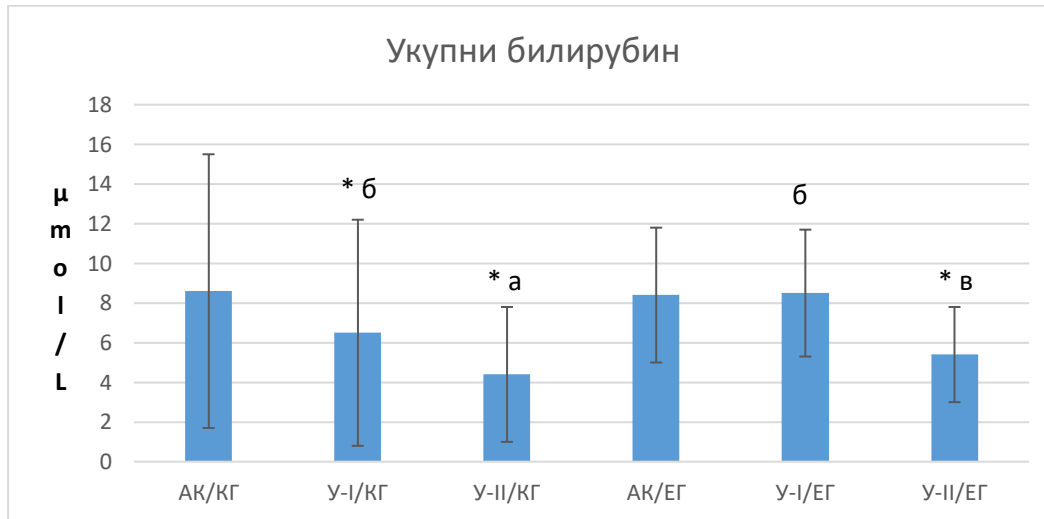
г У-І/ЕГ vs. У-ІІ/ЕГ ($p < 0.05$).

Концентрација креатинина показује статистички значајан пад у узорку І контролне групе (након инактивације), а затим статистички значајан пораст у узорку ІІ (после замрзавања/одмрзавања претходно третираног узорка) у односу на аутоконтролу. У експерименталној групи, не постоји статистички значајна разлика између аутоконтроле и узорка І, али постоји статистички значајан пораст концентрације између узорка І и узорка ІІ.

Такође, концентрација креатинина у ІІ узорку експерименталне групе је статистички значајно већа него у ІІ узорку контролне групе. Ово повећање концентрације нема клинички значај (дијаграм бр. 2).

4.1.3. Укупни билирубин (ТВ)

На дијаграму бр.3 приказане су вредности укупног билирубина: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације у експерименталној групи.



Дијаграм бр. 3. Концентрација укупног билирубина у испитиваним узорцима
Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/КГ = узорак І (PRT третирани); У-ІІ/КГ = узорак ІІ (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/ЕГ = узорак І (замрзнути/одмрзнути); У-ІІ/ЕГ = узорак ІІ (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

а АК vs. У-ІІ ($p < 0.05$).

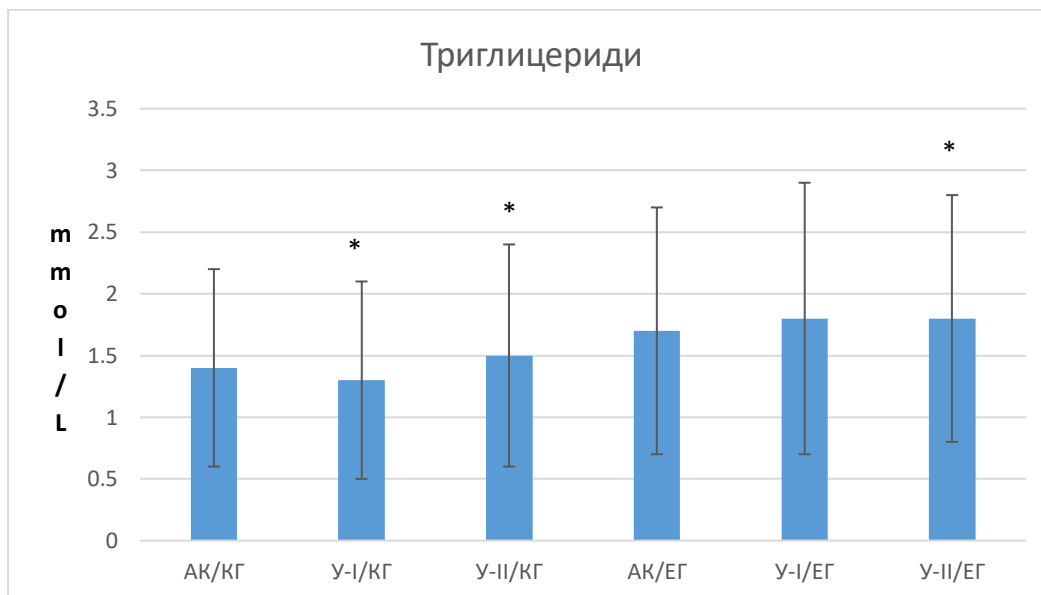
б АК vs. У-І ($p < 0.05$).

в У-І/ЕГ vs. У-ІІ/ЕГ ($p < 0.05$).

Као што је приказано на дијаграму бр. 3, укупни билирубин показује пад у концентрацији у узорку І и у узорку ІІ, у односу на аутоконтролу, који је статистички значајан. Такође је присутан статистички значајан пад концентрације ТВ у узорку ІІ у односу на узорак І у експерименталној групи. Не постоји статистички значајна разлика у концентрацијама ТВ у узорку ІІ између контролне и експерименталне групе.

4.1.4. Триглицериди (Tr)

На дијаграму бр. 4 приказане су вредности триглицерида: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у групи претходно инаktivисане плазме, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инаktivације у групи накнадно инаktivисане плазме.

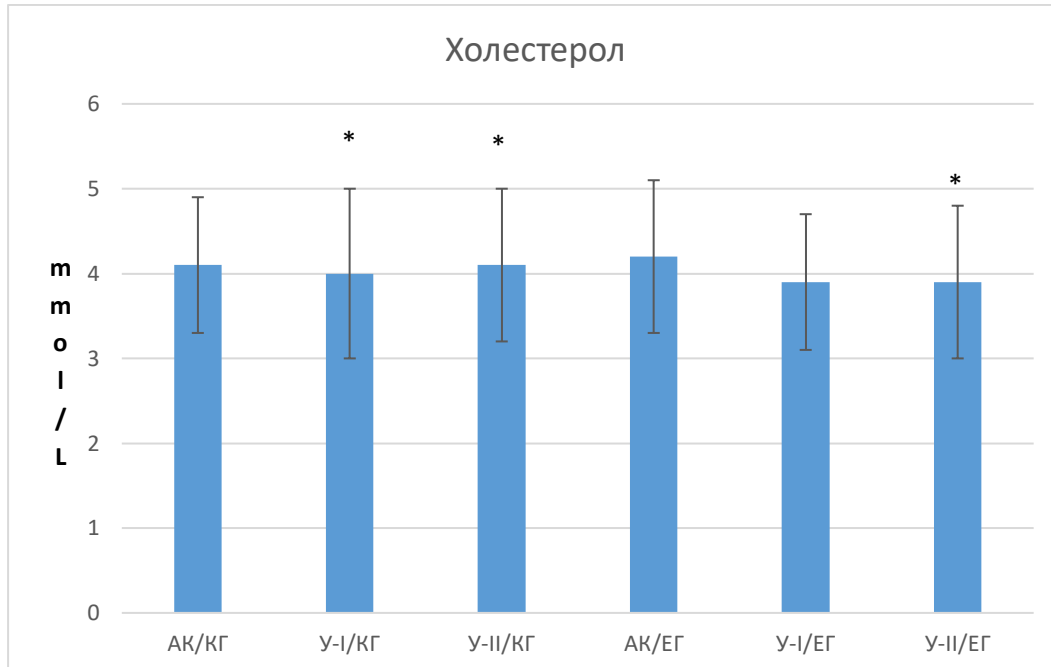


Дијаграм бр. 4. Концентрација триглицерида у испитиваним узорцима
Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).
Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

На дијаграму бр. 4 приказане су концентрације триглицерида у испитиваним групама. Као што се види из дијаграма, не постоји статистички значајна разлика између аутоконтроле и узорка I нити између аутоконтроле и узорка II како у контролној тако и у експерименталној групи, нити постоји статистички значајна интергрупна разлика.

4.1.5. Холестерол (Chol)

На дијаграму бр. 5 приказане су вредности холестерола: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације у експерименталној групи.



Дијаграм бр. 5. Концентрација холестерола у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-И/КГ = узорак I (PRT третирани); У-ИИ/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

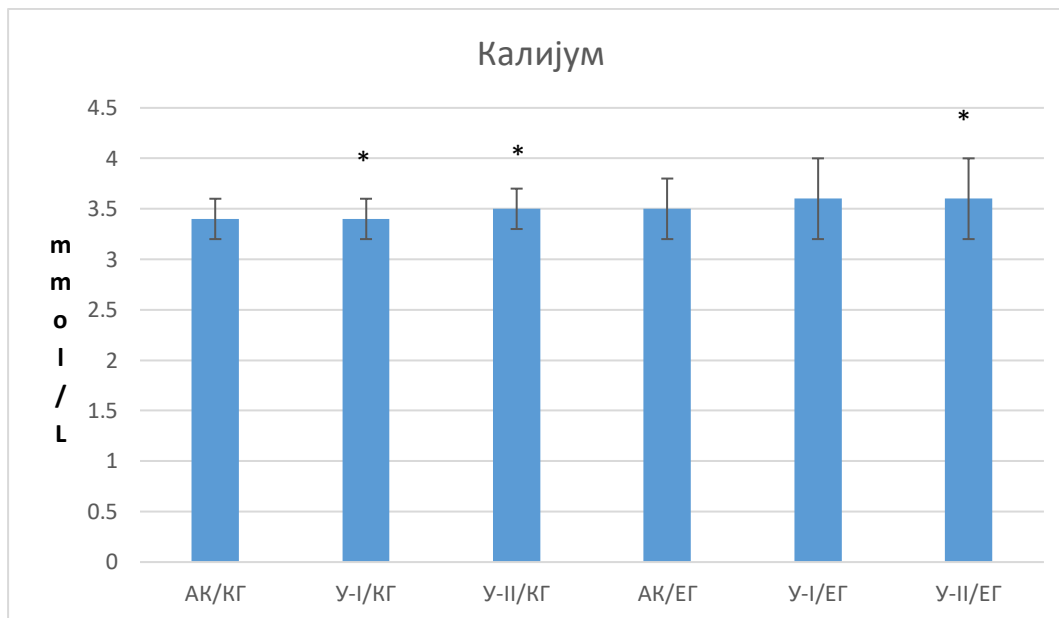
Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-И/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-ИИ/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

На дијаграму бр. 5 је приказана концентрација холестерола у испитиваним групама. Није утврђена статистички значајна разлика у концентрацији холестерола између аутоконтроле и узорка I нити између аутоконтроле и узорка II како у контролној тако и у експерименталној групи, нити постоји статистички значајна интергрупна разлика.

4.1.6. Калијум (K)

На дијаграму бр. 6 приказане су вредности калијума: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације у експерименталној групи.



Дијаграм бр. 6. Концентрација калијума у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

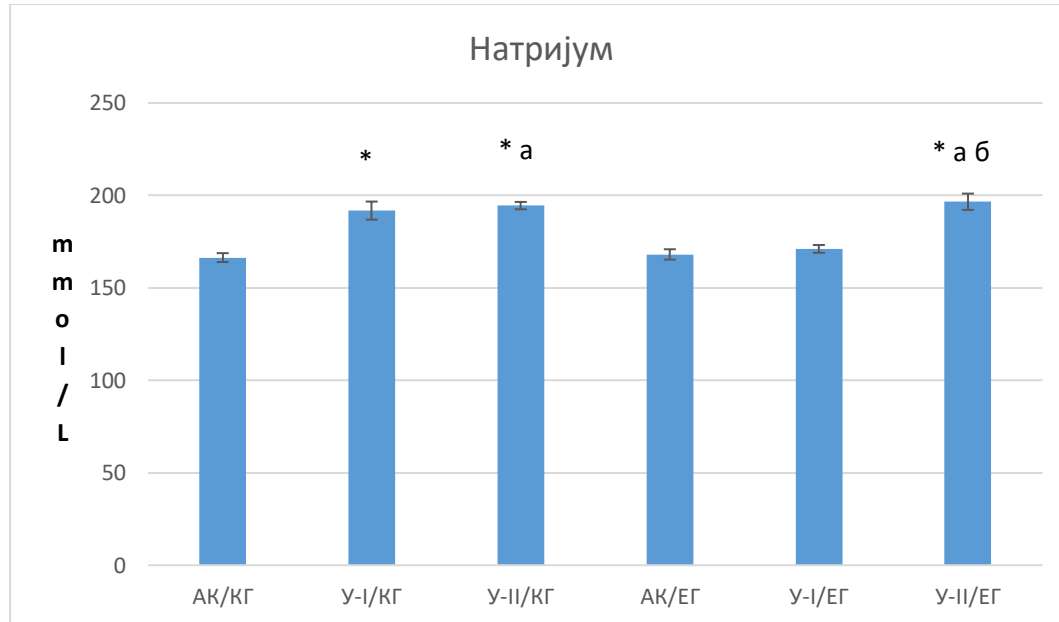
Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

Концентрација калијума у аутоконтроли и узорцима I и II не показује статистички значајне промене под утицајем RB/UV третмана ни међусобно ни између контролне и експерименталне групе (дијаграм бр. 6).

4.1.7. Натријум (Na)

На дијаграму бр. 7 приказане су вредности натријума: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.



Дијаграм бр. 7. Концентрација натријума у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

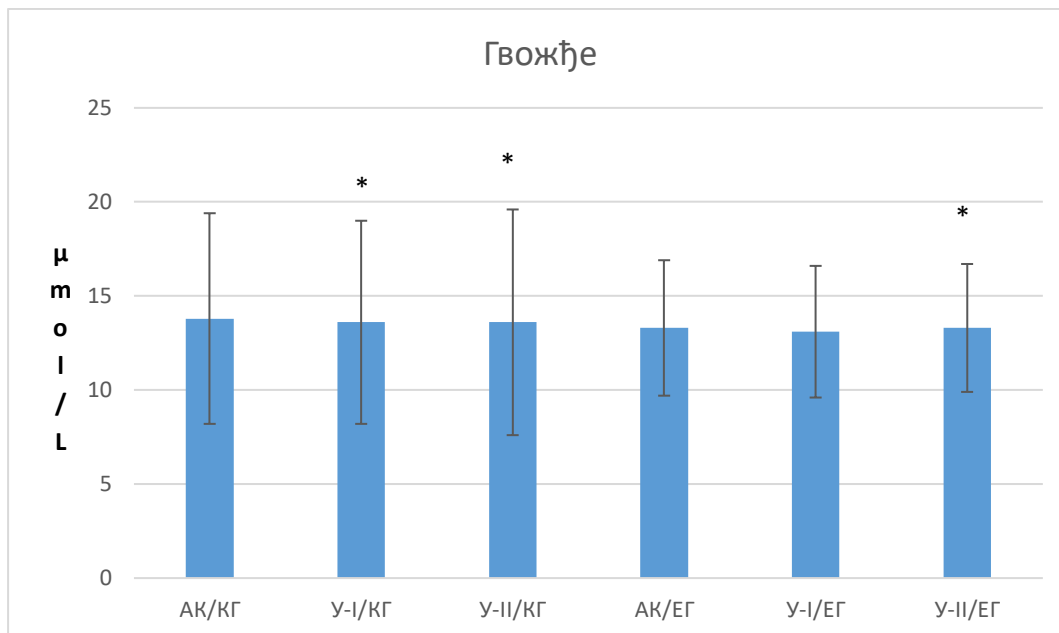
а АК vs. У-II ($p < 0.05$).

б У-I vs. У-II ($p < 0.05$).

Концентрација натријума расте током целе процедуре, тј. после RB/UV третмана, али и после замрзавања/одмрзавања, с тим што је раст статистички значајан између аутоконтроле и узорака II у обе групе и између узорака I и II у експерименталној групи. Нема статистички значајне разлике између контролне и експерименталне групе (дијаграм бр. 7).

4.1.8. Гвожђе (Fe)

На дијаграму бр. 8 приказане су вредности гвожђа: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.



Дијаграм бр. 8. Концентрација гвожђа у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

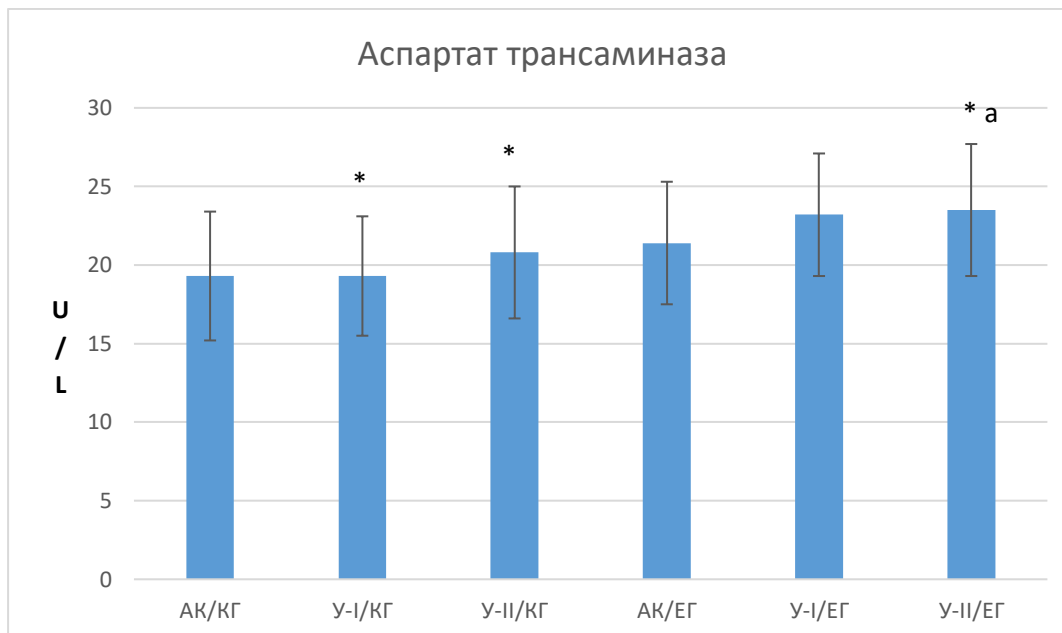
Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

Концентрација гвожђа је приказана на дијаграму бр. 8. Као што се види, концентрација гвожђа показује постојаност у свим корацима третирања плазме и не показује значајну варијацију у концентрацији између узорака нити између група.

4.1.9. Аспартат трансминаза (AST)

На дијаграму бр. 9 приказане су вредности аспартат трансминазе: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања контролне групе, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.

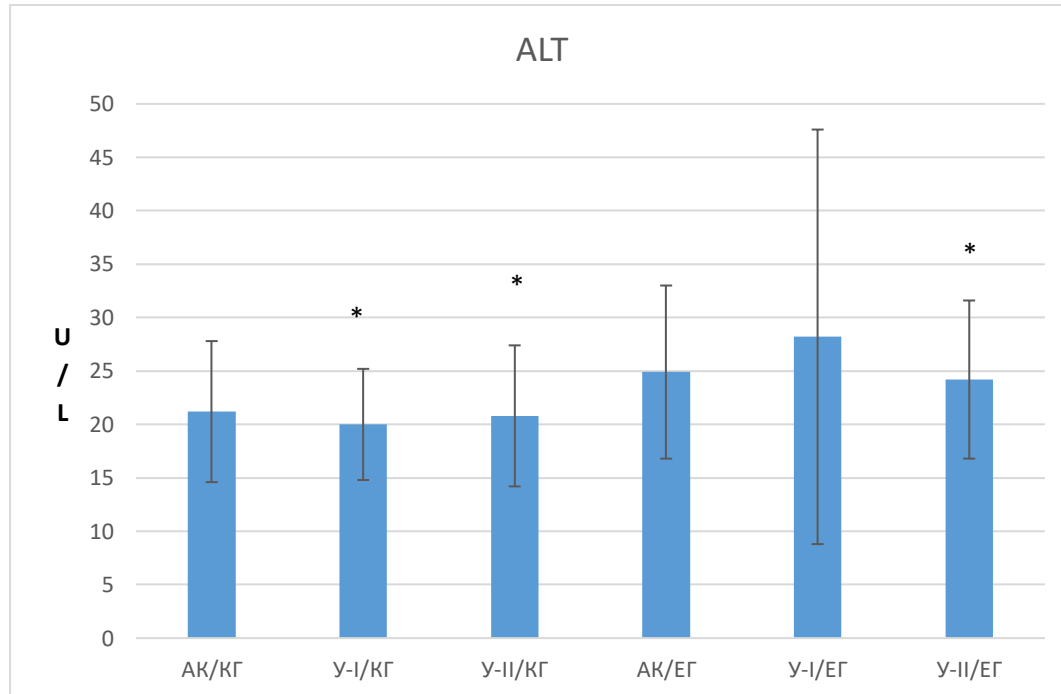


Дијаграм бр. 9. Концентрација аспартат трансминаза у испитиваним узорцима
Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/КГ = узорак I (PRT третирани); У-ІІ/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).
Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-ІІ/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.
a У-ІІ_{КГ} vs. У-ІІ_{ЕГ} ($p < 0.05$).

Аспартат трансминаза (AST) показује благи пораст концентрације унутар сваке групе при чему нема статистички значајне разлике између аутоконтроле, узорака I и II унутар група али, постоји статистички значајан раст вредности AST у узорку II експерименталне групе у односу на узорак II контролне групе (дијаграм бр. 9).

4.1.10. Аланин аминотрансфераза (ALT)

На дијаграму бр. 10 приказане су вредности урее: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације у експерименталној групи.

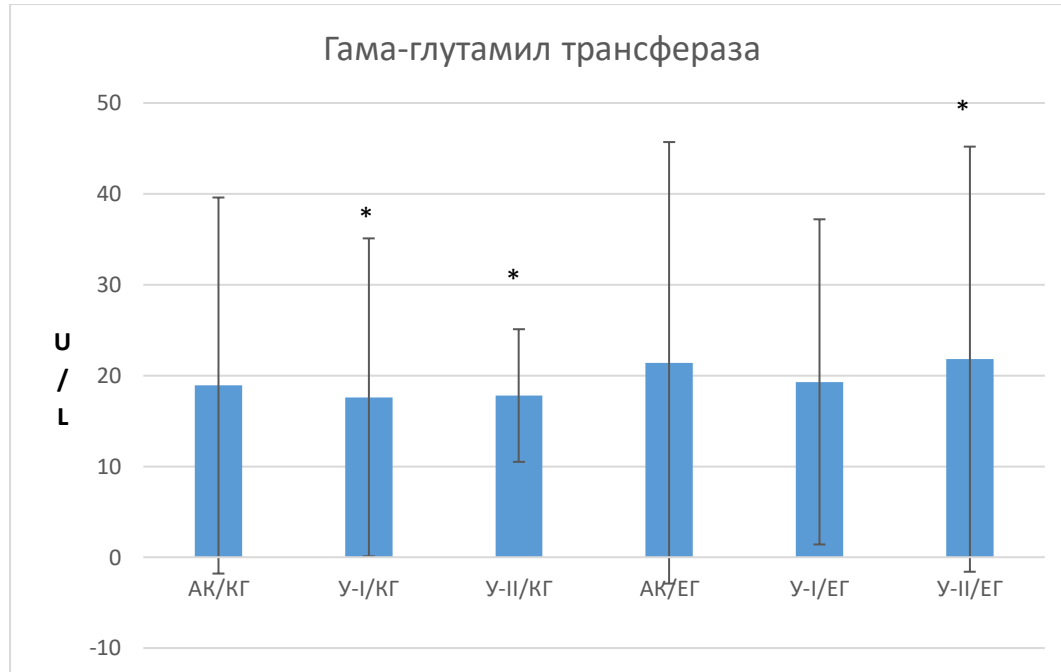


Дијаграм бр. 10. Концентрација аланин аминотрансфераза у испитиваним узорцима
Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).
Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

Аланин аминотрансфераза (ALT), са малим варијацијама задржава приближно константне вредности током целог процеса, без статистички значајних разлика унутар и између група (дијаграм бр. 10).

4.1.11. Гама-глутамил трансфераза (GGT)

На дијаграму бр. 11 приказане су вредности гама-глутамил трансферазе: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.

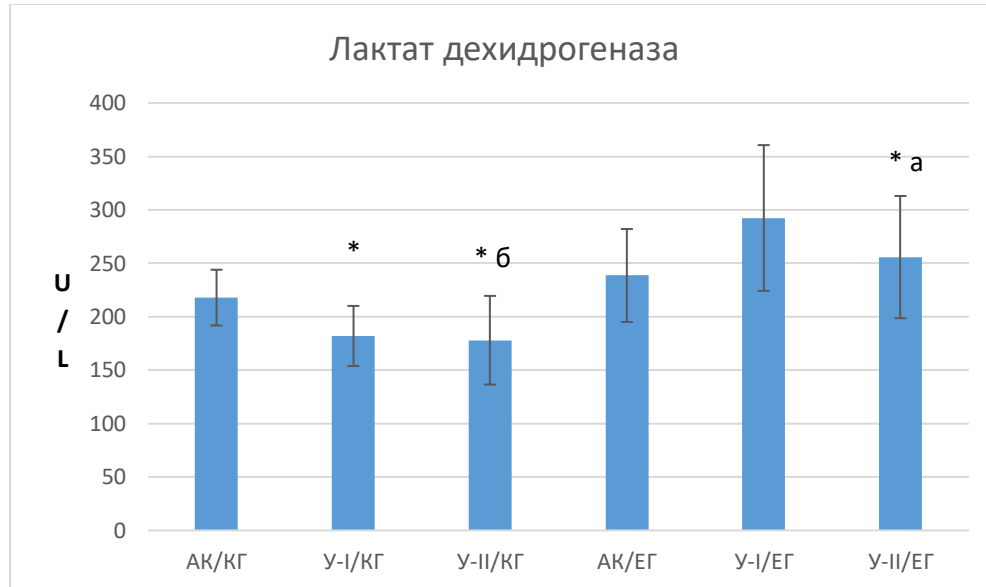


Дијаграм бр. 11. Концентрација гама-глутамил трансфераза у испитиваним узорцима
Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).
Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

Концентрација гама-глутамил трансферазе (GGT), такође, варира током свих корака процедуре, унутар обе групе, али без статистички значајних разлика унутар група, као ни између група.

4.1.12. Лактат дехидрогеназа (LDH)

На дијаграму бр. 12 приказане су вредности лактат дехидрогеназе: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања контролне групе, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.

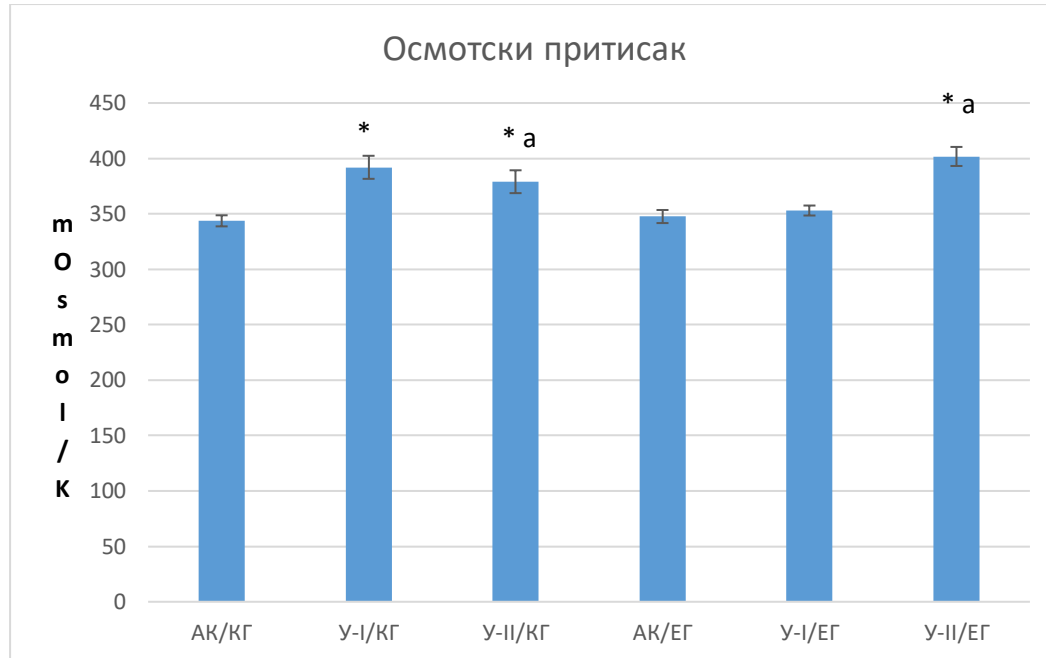


Дијаграм бр. 12. Концентрација лактат дехидрогеназе у испитиваним узорцима
Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).
Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.
а У-II_{КГ} vs. У-II_{ЕГ} ($p < 0.05$).
б АК vs. У-II ($p < 0.05$).

Као што је приказано у дијаграму бр. 12, вредности лактат дехидрогеназе (LDH) показују константан пад у оквиру контролне групе, при чему је разлика између аутоконтроле и узорка II статистички значајна. У експерименталној групи, након замрзавања/одмрзавања, концентрација LDH расте да би после RB/UV третмана поново пала али, и даље остала изнад почетне вредности, тј. аутоконтроле. Пораст вредности LDH у узорку II експерименталне групе у односу на исти узорак контролне групе је статистички значајан.

4.1.13. Осмотски притисак (*Osm-Pr*)

На дијаграму бр. 13 приказане су вредности осмотског притиска: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.



Дијаграм бр. 13. Вредности осмотског притиска у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/КГ = узорак I (PRT третирани); У-ІІ/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-ІІ/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

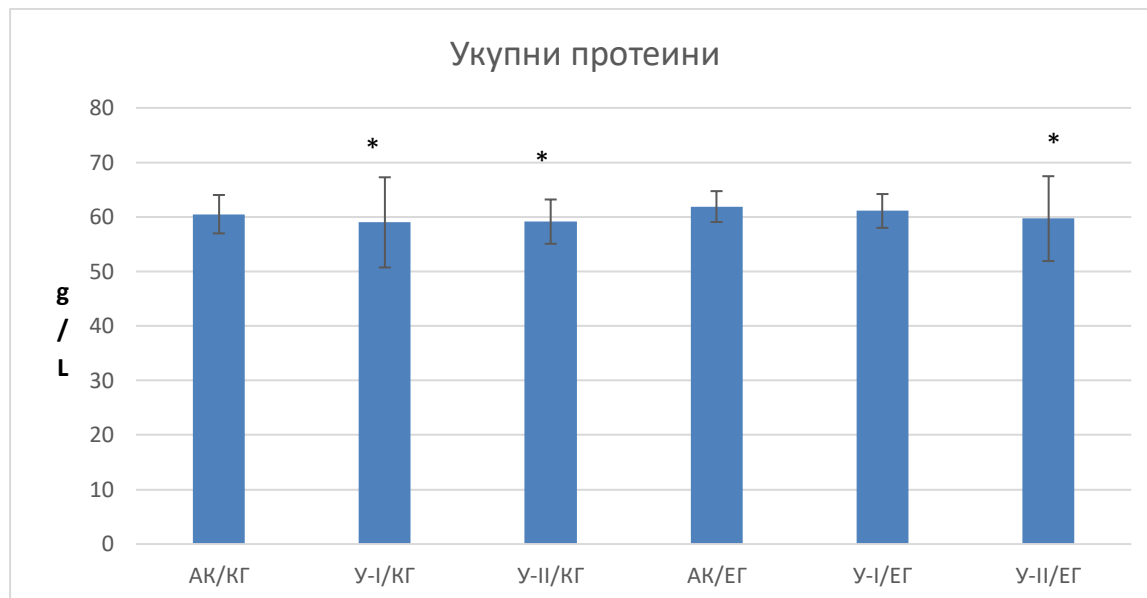
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

a АК vs. У-ІІ ($p < 0.05$).

На дијаграму бр. 13, приказано је како осмотски притисак постепено расте током сваке манипулације (RB/UV третман, замрзавање/одмрзавање) и, постоји статистички значајна разлика између аутоконтроле у узорку II у обе групе али, не постоји статистичка значајност између група

4.3.14. Протеини, укупни

На дијаграму бр. 14 приказане су вредности укупних протеина: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.



Дијаграм бр. 14. Вредности протеина у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-И/КГ = узорак I (PRT третирани); У-ИИ/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

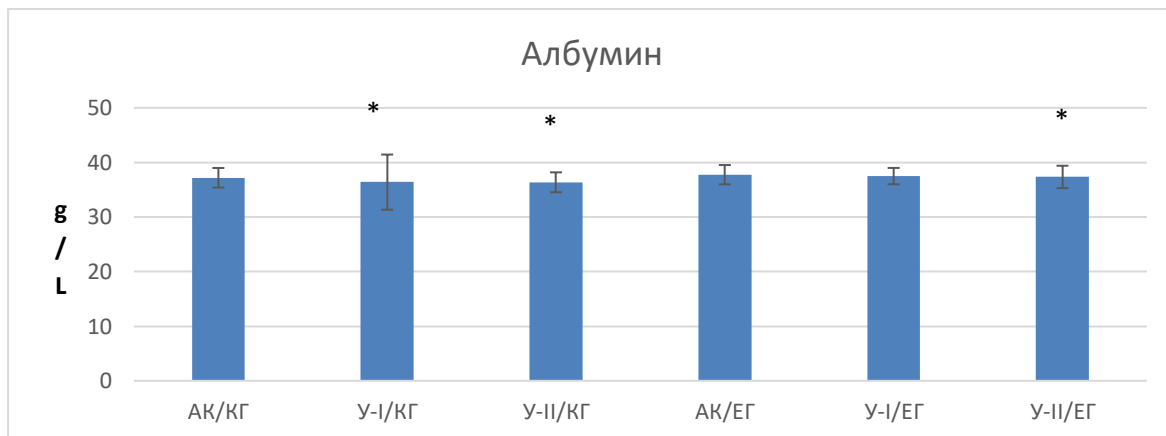
Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-И/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-ИИ/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

На дијаграму бр. 14 је приказано како укупни протеини показују врло благи пад концентрације током оба начина примене ПРТ, без статистички значајних разлика унутар група као и између група.

4.3.15. Албумин

На дијаграму бр. 15 приказане су вредности албумина: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.



Дијаграм бр. 15. Вредности албумина у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

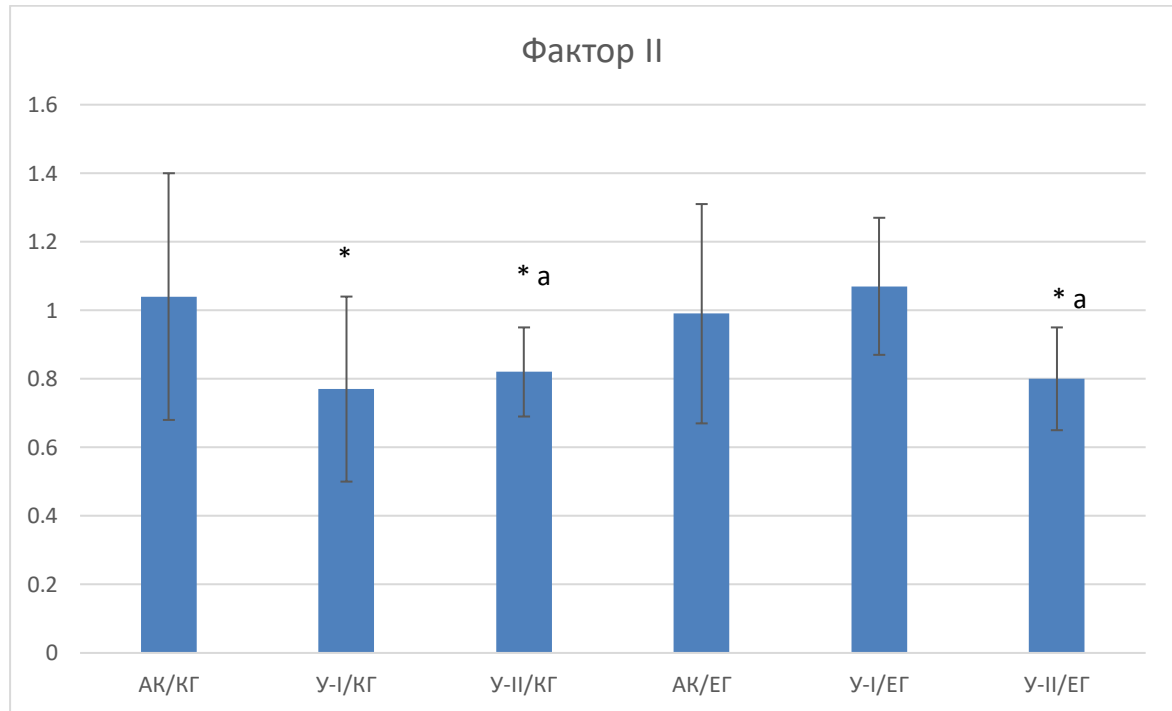
На дијаграму бр. 15 су приказане вредности албумина које такође, показују незнатан пад у контролној групи, од почетних вредности ка крајњем узорку, без статистички значајних разлика док је у експерименталној групи тај пад још нижи.

4.2. Прокоагулантни и антикоагулантни фактори хемостазе

У највећем броју индикација, прокоагулантни фактори су основни разлог клиничке примене плазме те је њихова постојаност у плазми под утицајем PR/PI третмана од пресудног значаја у евалуацији користи таквог третмана.

4.2.1. Фактор II (протромбин)

На дијаграму бр. 16 приказане су вредности протромбина: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи-метода претходне инактивације, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације у експерименталној групи- метода накнадне инактивације.



Дијаграм бр. 16. Вредности активности протромбина у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

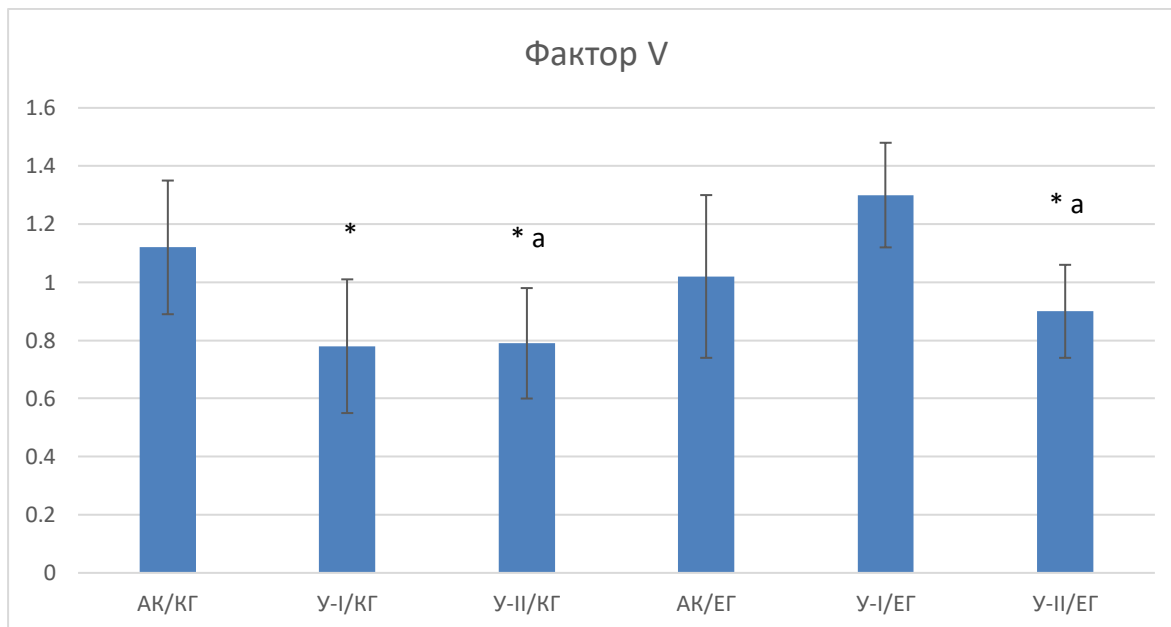
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

a АК vs. У-II ($p < 0.05$).

Протромбин показује варијације у својој активности током различитих корака у оквиру ПРТ третмана, са падом у коначном узорку и статистички значајном разликом између аутоконтроле и узорка II, како у контролној, тако и у експерименталној групи. Статистички значајна разлика у активности протромбина између узорка II контролне и експерименталне групе, не постоји (дијаграм бр. 16).

4.2.2. Фактор V

На дијаграму бр. 17 приказане су вредности Фактора V: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.



Дијаграм бр. 17. Вредности активности Фактора V у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

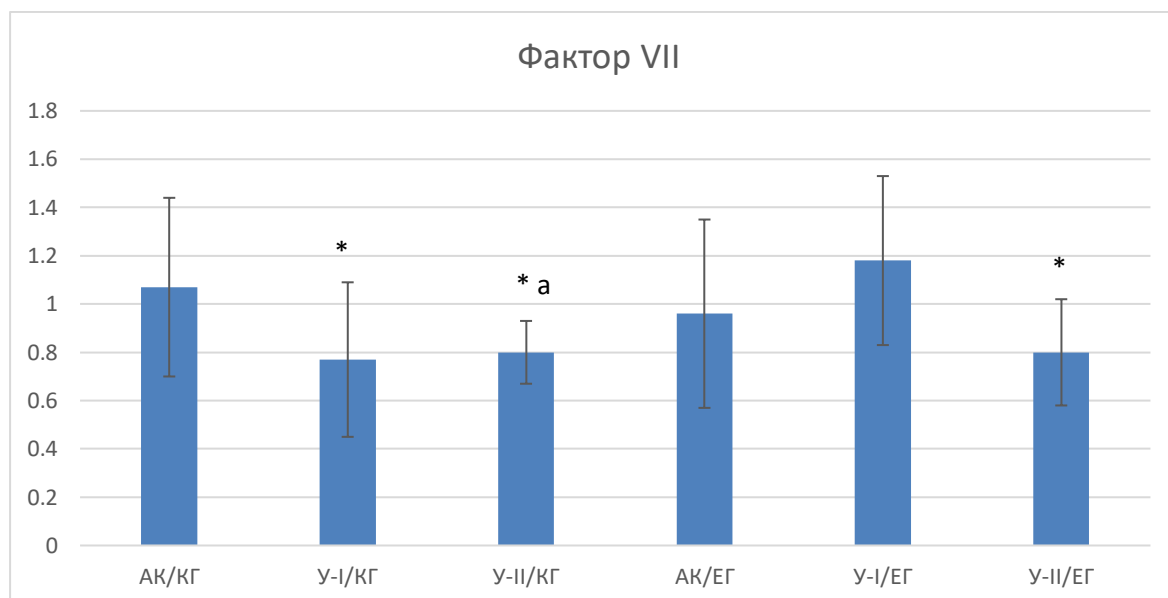
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

a АК vs. У-II ($p < 0.05$).

Фактор V показује константан пад активности у контролној групи и статистички значајну разлику између аутоконтроле и узорка II. У експерименталној групи, после замрзавања/одмрзавања постоји пораст активности фактора V праћен падом после RB/UV третмана са статистички значајном разликом између аутоконтроле и узорка II. Статистички значајна интергрупна разлика не постоји (дијаграм бр. 17).

4.2.3. Фактор VII

На дијаграму бр. 18 приказане су вредности Фактора VII: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.



Дијаграм бр. 18. Вредности активности Фактора VII у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

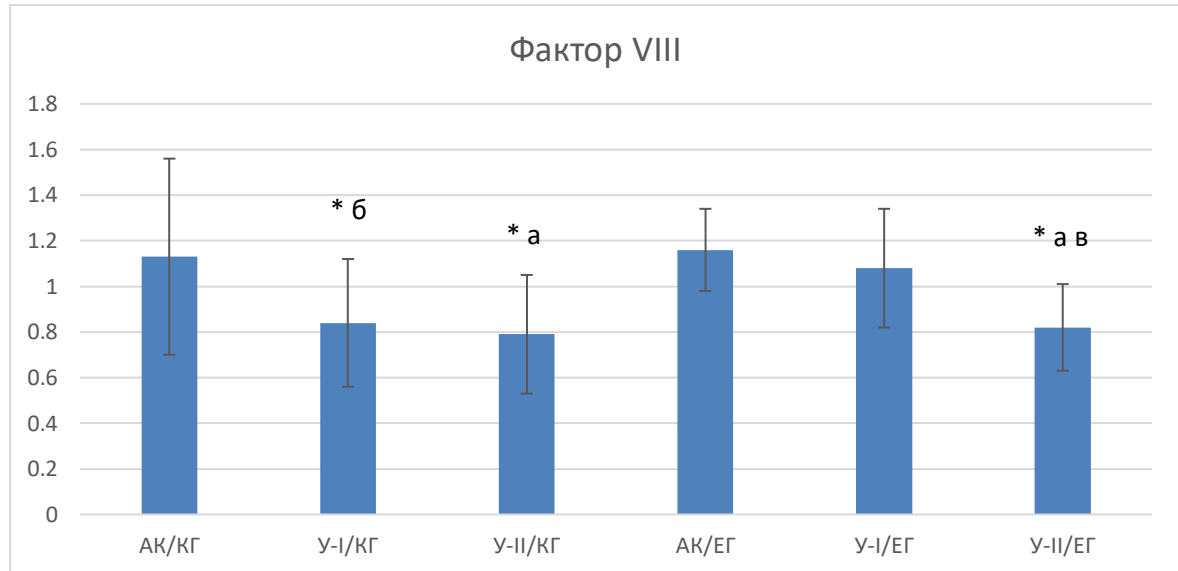
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

a АК/КГ vs. У-II/КГ ($p < 0.05$).

Фактор VII показује пад активности у контролној групи након сваке појединачне манипулације са статистички значајном разликом између аутоконтроле и узорка II. У експерименталној групи, након замрзавања/одмрзавања, уочава се благи раст активности који, после RB/UV третмана пада испод почетне вредности, али без статистички значајне разлике између узорка. Статистички значајна разлика између група не постоји (дијаграм бр. 18).

4.2.4. Фактор VIII

На дијаграму бр. 19 приказане су вредности Фактора VIII: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.

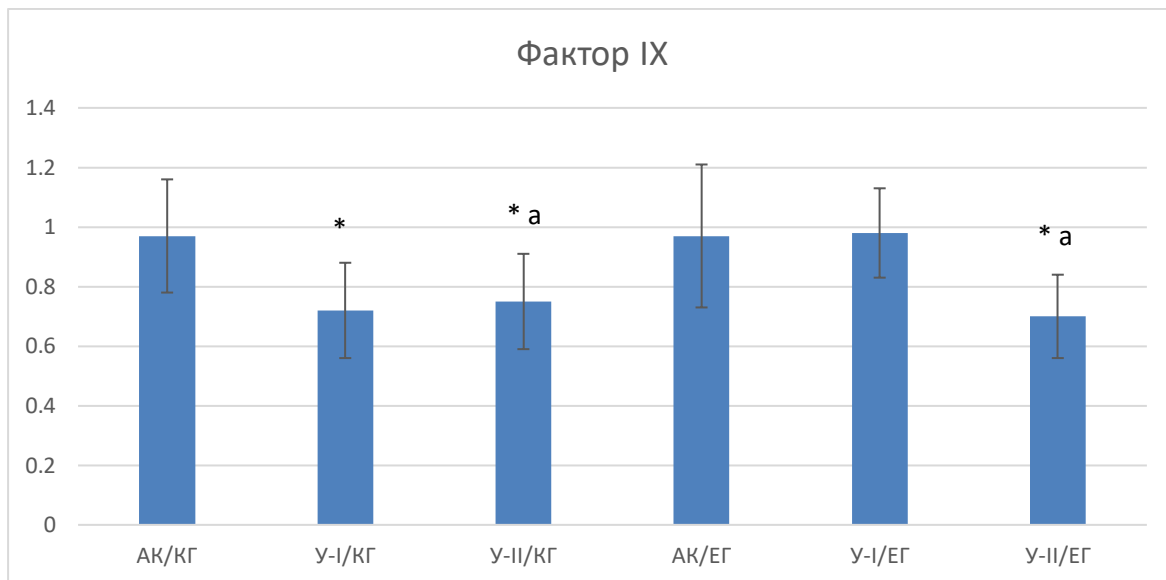


Дијаграм бр. 19. Вредности активности Фактора VIII у испитиваним узорцима
Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).
Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.
а АК vs. У-II ($p < 0.05$).
б АК/КГ vs. У-I/КГ ($p < 0.05$).
в У-I vs. У-II ($p < 0.05$).

Пад активности Фактора VIII се запажа у сва три узорка, у обе групе, са статистичком значајношћу између аутоконтроле и узорка I у контролној групи, аутоконтроле и узорка II како у контролној тако и експерименталној групи и између узорка I и II у експерименталној групи (дијаграм бр. 19). Статистички значајна разлика између група не постоји.

4.2.5. Фактор IX

На дијаграму бр. 20 приказане су вредности Фактора IX: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.



Дијаграм бр. 20. Вредности активности Фактора IX у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

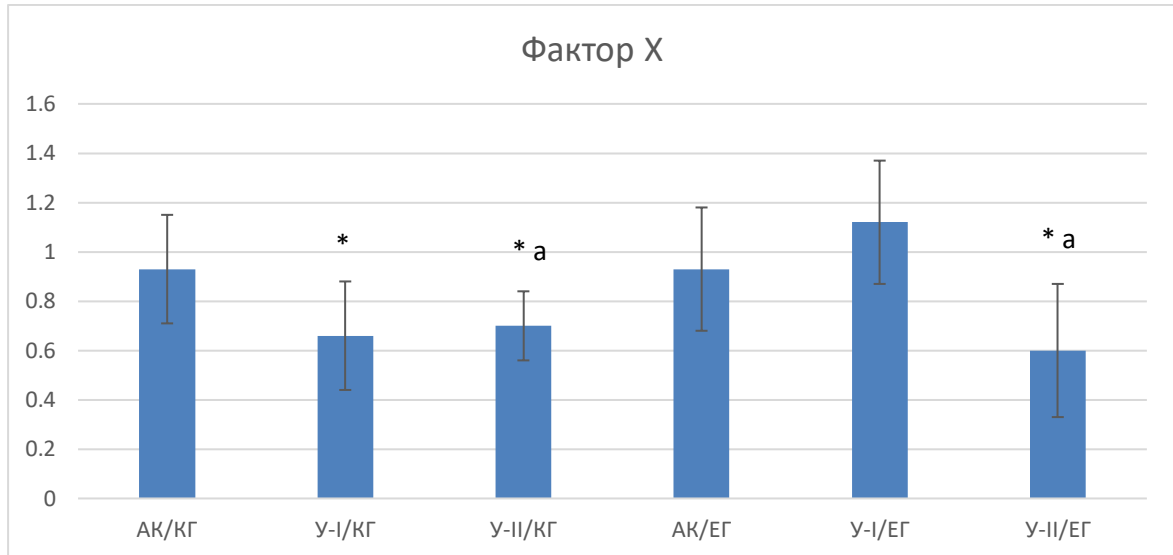
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

a АК vs. У-II ($p < 0.05$).

На дијаграму бр. 20 уочава се да Фактор IX показује умерен али константан пад активности од аутоконтроле ка узорку II у обе групе са статистичком значајношћу између аутоконтроле и узорка II у обе групе, а без статистички значајне интергрупне разлике.

4.2.6. Фактор X

На дијаграму бр. 21 приказане су вредности фактора X: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације у експерименталној групи.



Дијаграм бр. 21. Вредности активности Фактора X у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

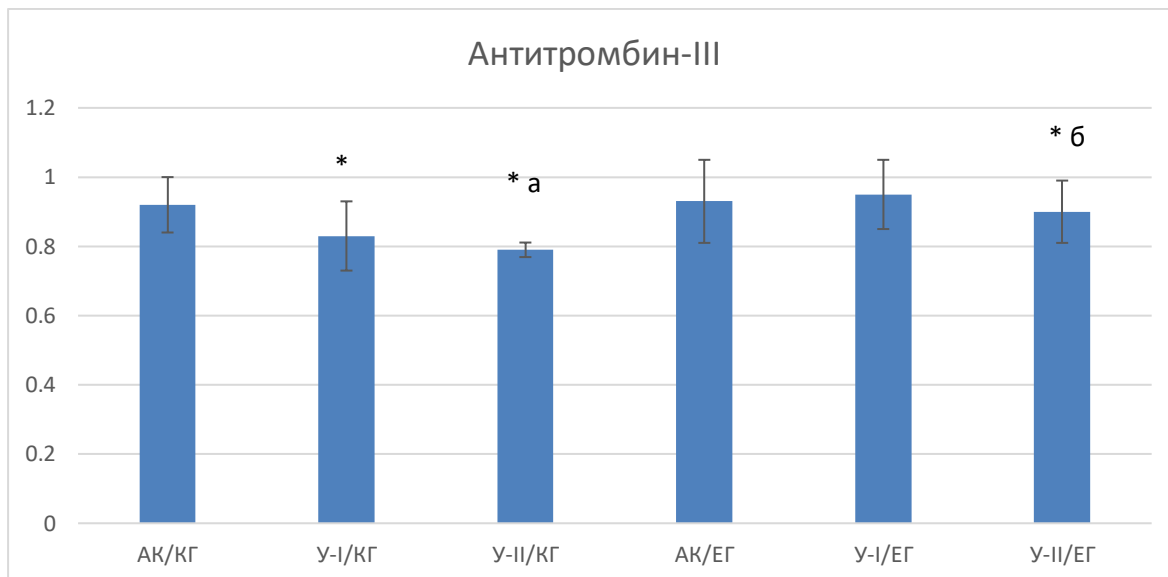
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

a АК vs. У-II ($p < 0.05$).

Фактор X показује пад активности након RB/UV третмана и одржавање тог нивоа након замрзавања/одмрзавања у контролној групи, са статистички значајном разликом између аутоконтроле и узорка II. У експерименталној групи, након замрзавања/одмрзавања се уочава раст активности фактора X који, након RB/UV третмана значајно пада и чини разлику између аутоконтроле и узорка II статистички значајном (дијаграм бр. 21). Статистички значајна разлика између група не постоји.

4.2.7. Антитромбин III (АТ-III)

На дијаграму бр. 22 приказане су вредности Антитромбин III: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације у експерименталној групи.



Дијаграм бр. 22. Вредности активности Антитромбина III у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-И/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-И/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

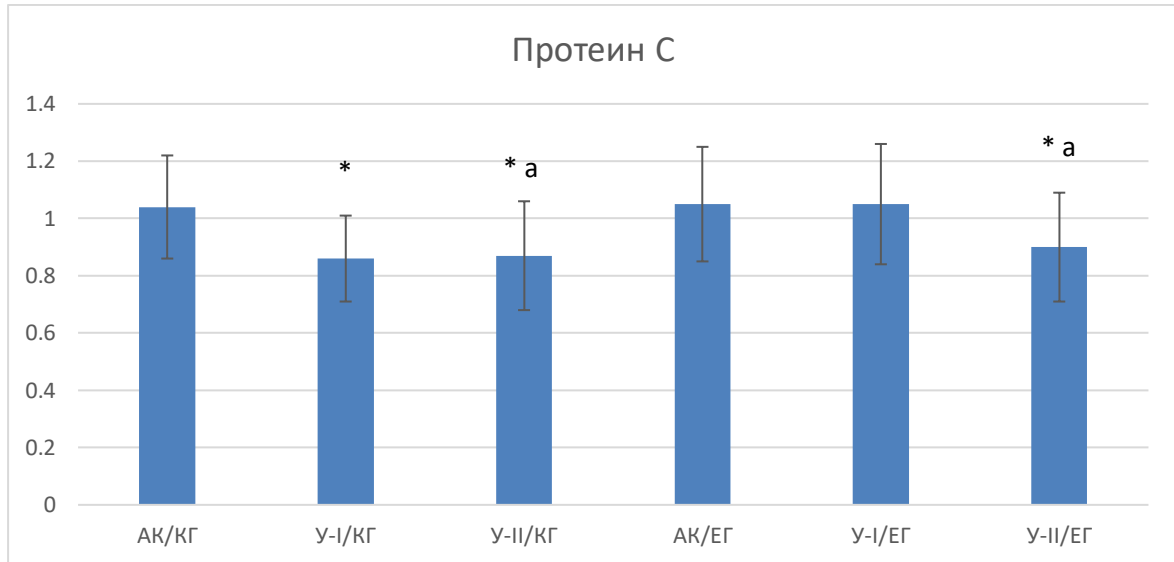
a АК vs. У-II ($p < 0.05$).

б У-II/КГ vs. У-II/ЕГ ($p < 0.05$).

Као што се види из дијаграма бр. 22, АТ-III у контролној групи благо али константно пада и постоји статистички значајна разлика између аутоконтроле и узорка II. У експерименталној групи активност овог природног инхибитора благо варира око почетних вредности. Вредност активности АТ-III у узорку II експерименталне групе је статистички значајно већа него у узорку II контролне групе ($p < 0.05$).

4.2.8. Протеин С (РС)

На дијаграму бр. 23 приказане су вредности Протеина С: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.



Дијаграм бр. 23. Вредности активности Протеина С у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/КГ = узорак І (PRT третирани); У-ІІ/КГ = узорак ІІ (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/ЕГ = узорак І (замрзнути/одмрзнути); У-ІІ/ЕГ = узорак ІІ (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

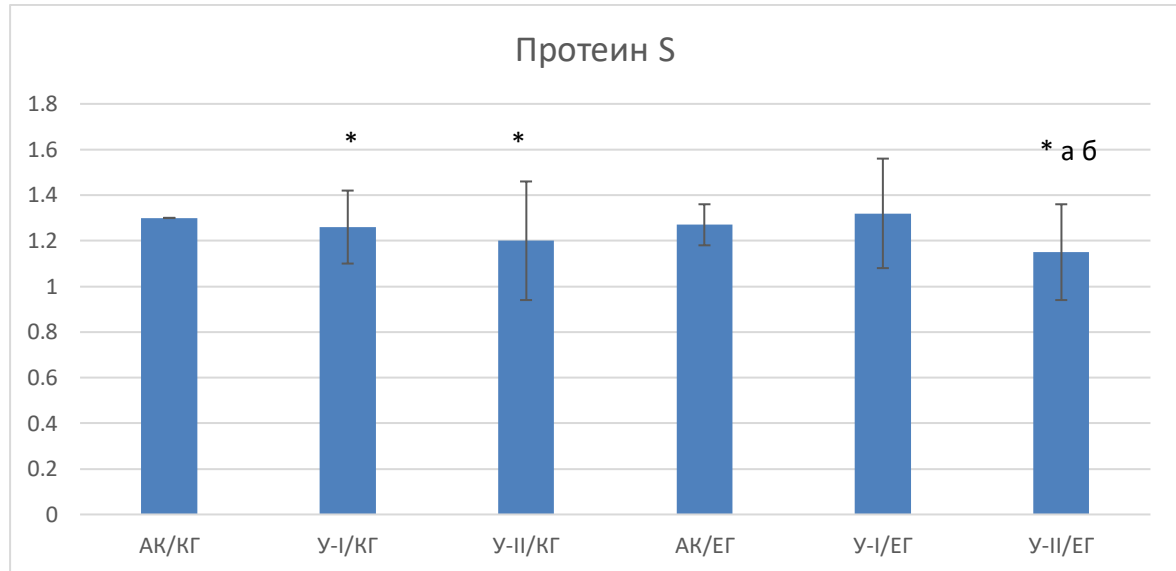
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

a АК vs. У-ІІ ($p < 0.05$).

РС показује тенденцију пада од аутоконтроле ка узорку ІІ у обе групе са статистички значајном разликом између аутоконтроле и узорка ІІ (дијаграм бр.23). Статистички значајне разлике између група нема.

4.2.9. Протеин S (PS)

На дијаграму бр. 24 приказане су вредности Протеина S: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације у експерименталној групи.



Дијаграм бр. 24. Вредности активности Протеина S у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

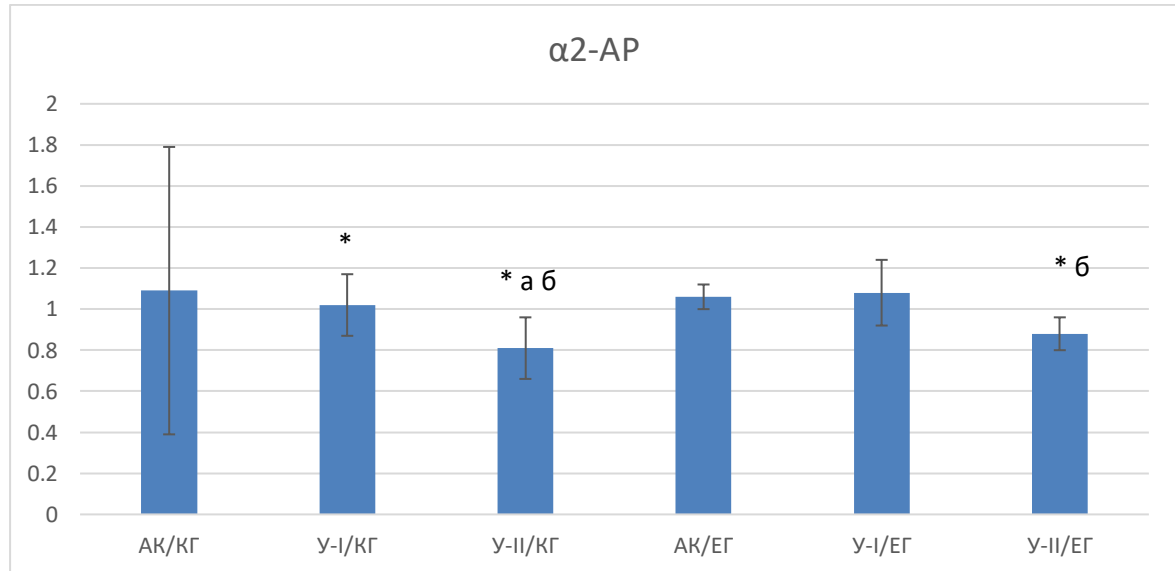
а АК vs. У-II ($p < 0.05$).

б У-I vs. У-II ($p < 0.05$).

На дијаграму бр. 24 се може видети да PS у контролној групи само благо пада од аутоконтроле ка узорку II, док у експерименталној групи после благог раста активности након замрзавања/одмрзавања, пада испод почетних вредности због чега постоји статистички значајна разлика између аутоконтроле и узорка II, као и између узорка I и узорка II. Међугрупна разлика нема статистичку значајност.

4.2.10. Алфа2- антиплазмин (α 2-AP)

На дијаграму бр. 25 приказане су вредности Алфа2- антиплазмина: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације у експерименталној групи.



Дијаграм бр. 25. Вредности активности α 2-AP у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-И/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-И/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

а АК vs. У-II ($p < 0.05$).

б У-I vs. У-II ($p < 0.05$).

Код анализе резултата α 2-AP запажа се да постоји значајнији пад активности тек у узорку II у обе групе при чему статистички значајна разлика у контролној групи постоји између аутоконтроле и узорка II, као и између узорка I и II, док у експерименталној групи статистички значајна разлика је само између узорка I и II. Нема статистички значајне разлике између крајњих узорка контролне и експерименталне групе. Дијаграм бр. 25.

Утицај PR/PI третмана са претходним или накнадним замрзавањем/одмрзавањем на про- и анти-коагулантне факторе може да се изрази као „израчунати опоравак“ када је исказан у процентима. Опоравак се рачуна као однос вредности после PR/PI третмана и замрзавања/одмрзавања према почетним – иницијалним вредностима посматраног фактора, пре *ex vivo* манипулације и приказан је у табели 1.

Табела 1. PR/PI третирана ЗСП – Израчунати опоравак про- и антикоагулационих фактора

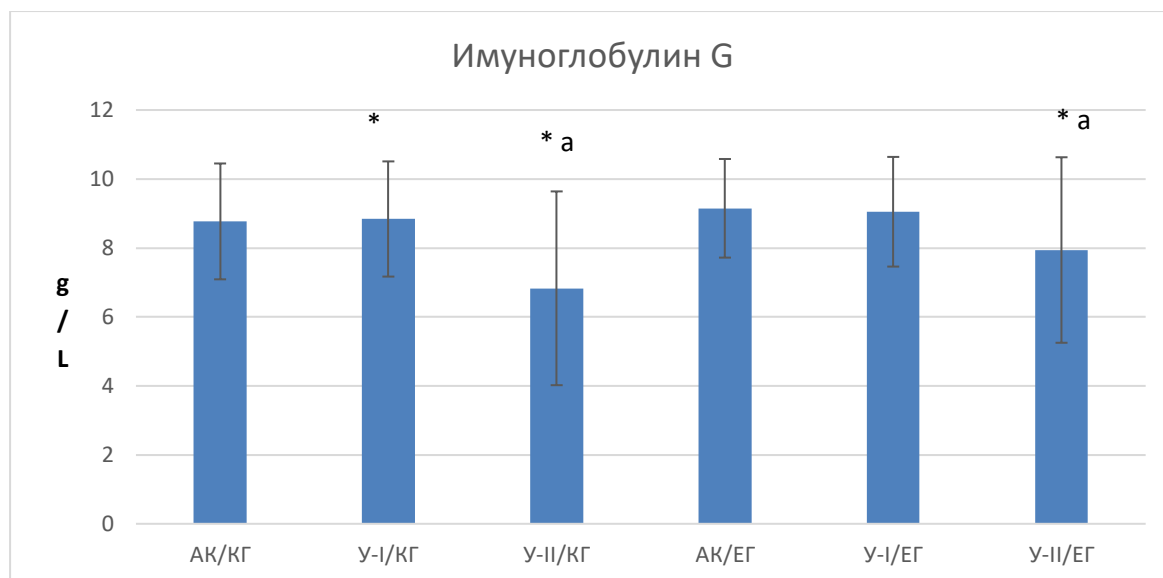
	Контролна група (%) (ПИ)	Експериментална група (%) (НИ)
FII	79	81
FV	71	88
FVII	75	83
FVIII	70	71
FIX	77	72
FX	75	65
AT-III	86	97
PC	84	86
PS	97	90
α 2-AP	69	83

4.3. Имуни фактори

Највећи значај плазме као извора антитела у жеку пандемије SARS-CoV-2 вируса јесте примена реконвалесцентне плазме. У овом контексту, титар створених неутралишућих антитела, нарочито на „spike“ вирусни протеин, је од критичног значаја, а самим тим и провера да ли PR/PI третман може довести до пада овог титра.

4.3.1. Имуноглобулин G (IgG)

На дијаграму бр. 26 приказане су вредности Имуноглобулина G: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.

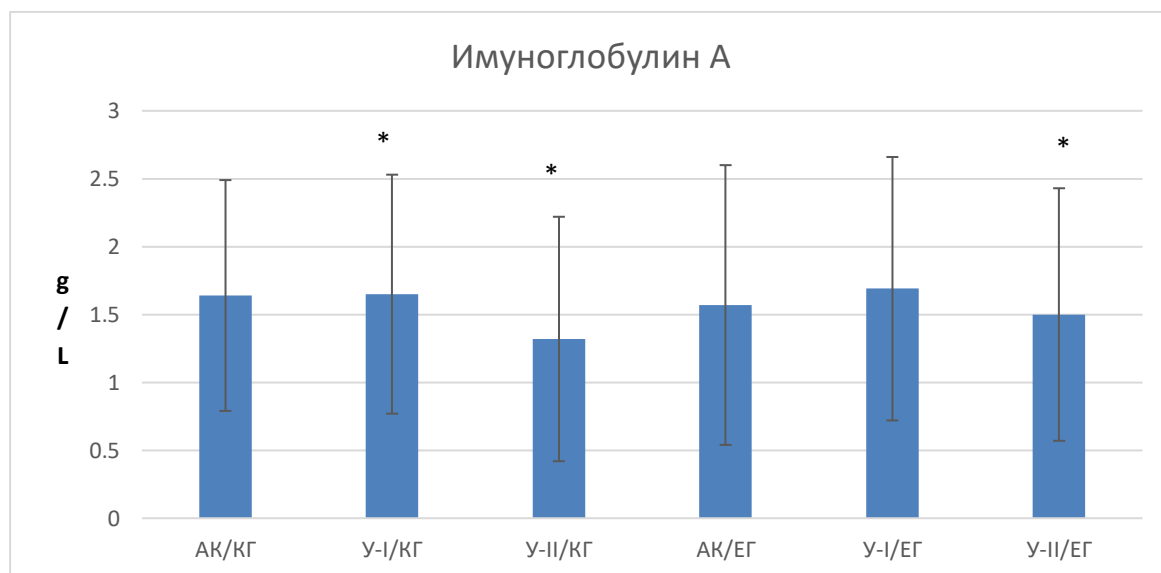


Дијаграм бр. 26. Вредности концентрације имуноглобулина G у испитиваним узорцима
Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).
Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.
a АК vs. У-II ($p < 0.05$).

Као што се из дијаграма бр. 26 може видети, концентрација IgG се одржава у узорку I у обе групе али, значајно пада у коначном, узорку II, тако да постоји статистички значајна разлика између аутоконтроле и узорка II како у контролној тако и у експерименталној групи. Разлика између група није статистички значајна.

4.3.2. Имуноглобулин А (IgA)

На дијаграму бр. 27 приказане су вредности Имуноглобулина А: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације у експерименталној групи.

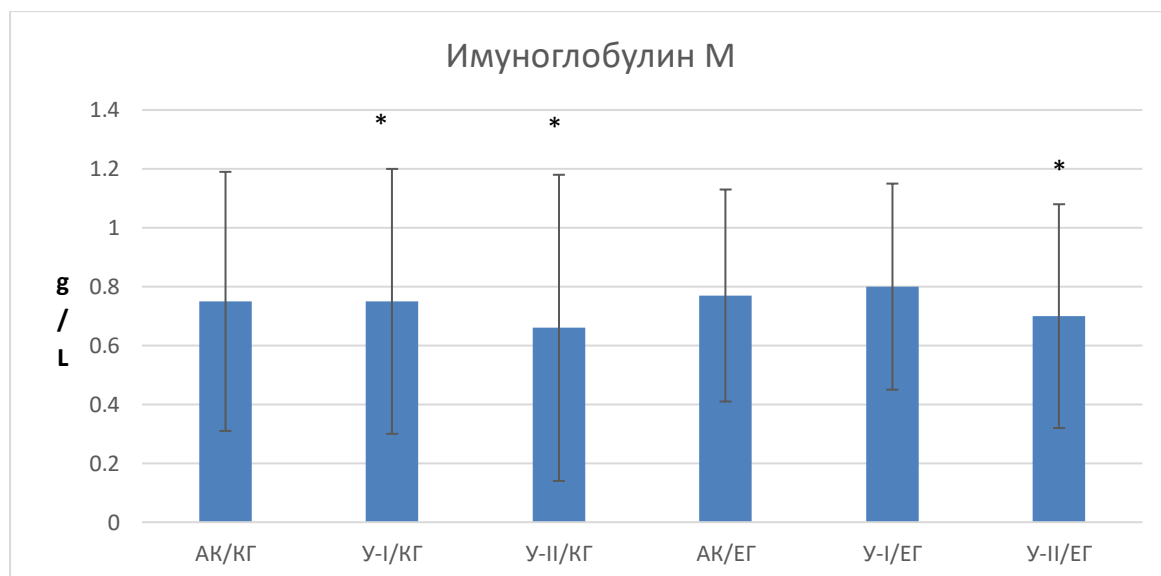


Дијаграм бр. 27. Вредности концентрације Имуноглобулина А у испитиваним узорцима
Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/КГ = узорак І (PRT третирани); У-ІІ/КГ = узорак ІІ (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).
Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/ЕГ = узорак І (замрзнути/одмрзнути); У-ІІ/ЕГ = узорак ІІ (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

Из дијаграма бр. 27 се види да се концентрација IgA одржава прилично константном са благим падом у узорку ІІ у обе групе али, без статистичке значајности.

4.3.3. Имуноглобулин М (IgM)

На дијаграму бр. 28 приказане су вредности Имуноглобулина М: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.

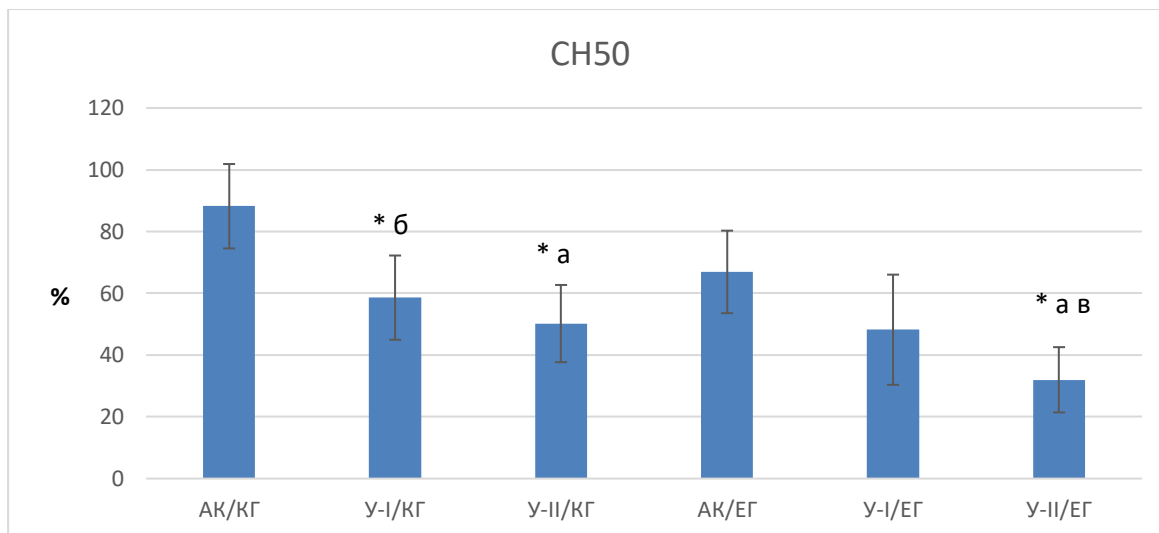


Дијаграм бр. 28. Вредности концентрације Имуноглобулина М у испитиваним узорцима
Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/КГ = узорак І (PRT третирани); У-ІІ/КГ = узорак ІІ (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).
Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-І/ЕГ = узорак І (замрзнути/одмрзнути); У-ІІ/ЕГ = узорак ІІ (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).
* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

Као што се види на дијаграму бр. 28, пад концентрације IgM је врло сличан као код IgA и нема статистички значајне разлике унутар нити између испитиваних група.

4.3.4. Укупна активност комплемента CH50

На дијаграму бр. 29 приказане су вредности активности комплемента CH50: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.



Дијаграм бр. 29. Вредности концентрације укупне активност комплемента CH50 у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

а АК vs. У-II ($p < 0.05$).

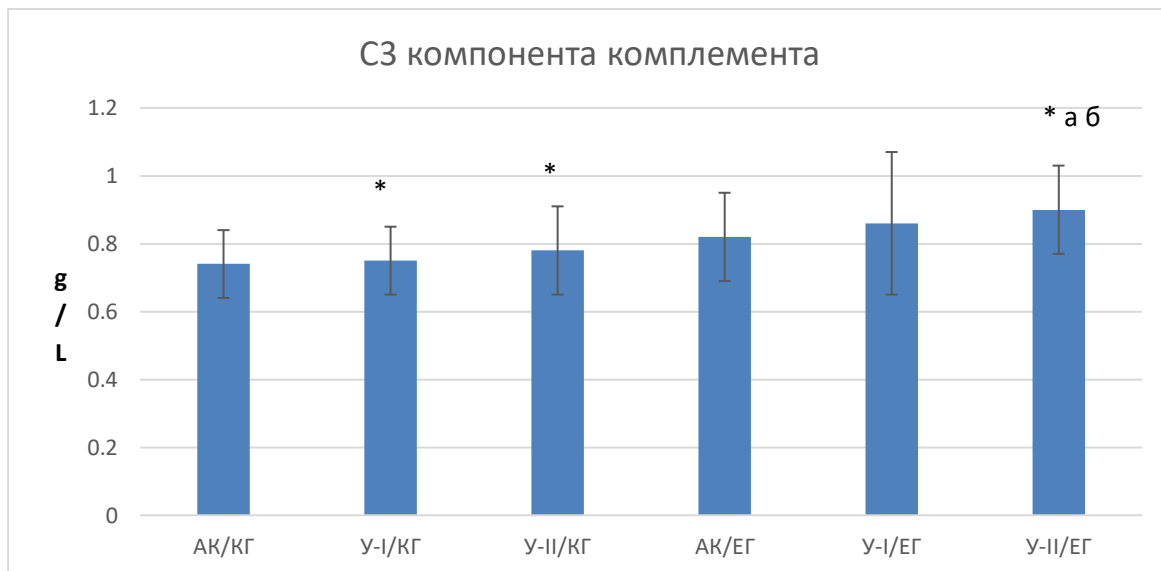
б АК/КГ vs. У-I/КГ ($p < 0.05$).

в У-I/ЕГ vs. У-II/ЕГ ($p < 0.05$).

Из дијаграма бр. 29 се види да CH50 значајно пада после RB/UV третмана у контролној групи, што се још више потенцира после замрзавања/одмрзавања. Постоји статистички значајна разлика између аутоконтроле контролне групе и узорка I, као и између аутоконтроле и узорка II у овој групи. У експерименталној групи, такође долази до пада вредности CH50 после замрзавања/одмрзавања, а затим још више после RB/UV третмана, а статистички значајна разлика постоји између аутоконтроле и узорка II као и између узорка I и узорка II. Између група нема статистички значајне разлике.

4.3.5. C3 компонента комплемента

На дијаграму бр. 30 приказане су вредности C3 компоненте комплемента: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.



Дијаграм бр. 30. Вредности концентрације C3 компоненте комплемента у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

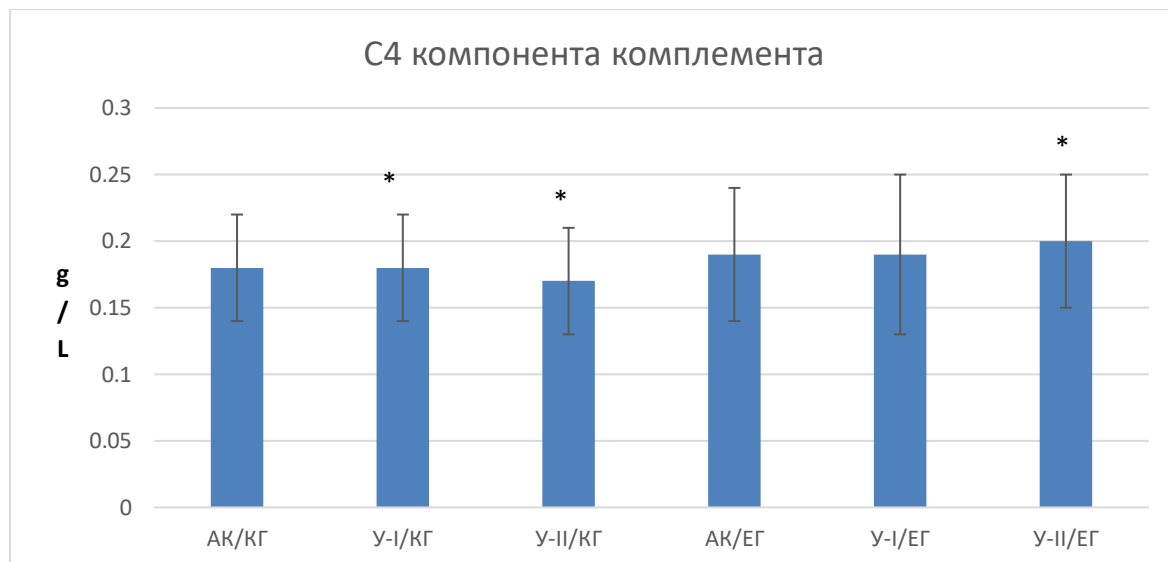
а АК vs. У-II ($p < 0.05$).

б У-II/КГ vs. У-II/ЕГ ($p < 0.05$).

Као што се уочава на Дијаграму бр. 30, компонента комплемента C3 показује веома благи раст у контролној групи, а значајан раст у експерименталној групи. У експерименталној групи, постоји статистички значајна разлика између аутоконтроле и узорка II. Такође, као што се види из дијаграма бр. 30, вредност C3 узорка II експерименталне групе је статистички значајно већа од вредности C3 узорка II контролне групе.

4.3.6. C4 компонента комплемента

На дијаграму бр. 31 приказане су вредности C4 компоненте комплемента: почетне, после редукције патогена и после замрзавања/одмрзавања у контролној групи, односно, почетне, после замрзавања/одмрзавања и после инактивације експерименталне групе.



Дијаграм бр. 31. Вредности концентрације C4 компонента комплемента у испитиваним узорцима

Контролна група: АК/КГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/КГ = узорак I (PRT третирани); У-II/КГ = узорак II (PRT третирани, замрзнути/одмрзнути).

Експериментална група: АК/ЕГ = почетни узорак (аутоконтрола); У-I/ЕГ = узорак I (замрзнути/одмрзнути); У-II/ЕГ = узорак II (замрзнути/одмрзнути, PRT третирани).

* Урачунат фактор дилуције додатог RB.

Компонента комплемента C4 има исти ниво у аутоконтроли и узорку I како контролне тако и експерименталне групе и врло благи пораст у узорку II обе групе, без статистичке значајности (дијаграм бр. 31).

5. ДИСКУСИЈА

Замрзнута свежа плазма, уз еритроците и тромбоците је крвни продукт добијен из целе крви, а користи се у терапијске и профилактичке сврхе. Како се крвљу могу пренети узрочници различитих болести, то је последњих деценија уведен читав низ мера у циљу превенције овакве трансмисије. У ове мере спадају детаљна анкета (упитник за даваоце) са посебним нагласком на ризично понашање и боравак у земљама где су трансфузијом преносиве инфекције честе, а код нас се не раде тестови на њихове узрочнике. Са друге стране, серолошки тестови за детекцију оних ТТГ агенаса чије се присуство у крви испитује, HBV, HCV, HIV и луес се непрестано усавршавају постајући још осетљивији и специфичнији. Крајем 90-тих година двадесетог века уведена је техника ланчане реакције полимеразе (Polymerase Chain Reaction – PCR), метода која детектује присуство нуклеинских киселина (HBV, HCV, HIV) у узорку крви давалаца (66).

Такође у рутинску употребу су уведене кесе за прикупљање крви које имају посебну-додатну кесицу, у коју се преусмерава први млаз крви (5-7 мл), како би се евентуално присутне бактерије на кожи (недовољно дезинфикованој), спречиле да уђу у примарну кесу. Поред тога, уводи се све више универзална леукофилтрација у циљу отклањања леукоцита као извора вируса, затим карантинска плазма која се чува одређено време (док се давалац ретестира), не би ли се и теоретска могућност преноса агенаса искључила (67).

Међутим, ризик од трансмисије је тиме само смањен, а потпуно га је немогуће елиминисати због следећих разлога:

а) постојање тзв. „периода прозора“ током којег је данас постојећим тестовима немогуће детектовати присуство маркера ТТГ. Технологија NAT (Nucleic Acid Testing) је овај период значајно скратила али га није елиминисала. За HBV, интервал је скраћен са 59 на 21 дан (42), за HCV, са 40, ако се користи комбиновани антиген/антитело тест (HCVAg/Ab), на 15 (мини пул), тј. на просечно 4,9 дана код тестирања појединачних узорака (42,68), а за HIV (комбиновани тест - HIV Ag/ Ab) са 16 на 9 дана-тестирање у мини пулу, тј. просечно 5,6 дана код појединачно тестираних узорака (42).

б) појава нових патогена – током последњих 40 година идентификовано је око 50 нових инфективних агенаса (69);

ц) присуство паразита (не ради се тестирање) и бактерија.

Поред огромног напредка на пољу превенције главних ТТГ, потребан је дуг пут од препознавања ризика преношења неке болести крвљу до имплементације превентивне стратегије. Од почетка увођења тестова, тај интервал се скраћује: за HBV, од тренутка препознавања чињенице да се преносе трансфузијом до увођења првог теста прошло је око 30 година; за HCV око 15 година, а за HIV три године. Међутим, за те три године, у САД је забележено више од 14000 трансмисија вируса трансфузијом које су се, углавном, завршавале фатално (70).

Гледано из данашњег угла, овакав приступ: утврдити ризик од преноса неке болести путем крви и крвних продуката, изоловати узрочника, направити тестове и увести их у рутинску употребу, може се практично сматрати неуспехом трансфузијске медицине, јер знатан број прималаца крви и крвних продуката бива заражен пре него што се тест уведе (35).

Осим тога, данас највећи инфективни ризик представљају зоонозе. Наиме, животињски вируси доспевају у човека било кроз ланац исхране (случај са „variant Creutzfeldt Jakob disease“, одн. болест лудих крава) или преко трансмисије векторима-комарцима, крпељима и другим инсектима. Већина, ако не и сви ти агенси преносе се

трансфузијом. У ове векторске, трансфузијом преносиве болести спадају: маларија, „dengue fever“, „Chikungunya“, „WNV-associated fever and meningoencephalitis“, „babesiosis“, „Colorado tick fever“ и „Chagas disease“, док би се за Lyme-ску болест, висцералну leishmaniozu и encephalitis изазван flavivirus-ом такође могло испоставити да се преносе трансфузијом (35, 71).

Дакле, да би се скратио пут превенције трансфузиолошког преноса ових и других, тренутно непознатих болести, треба прећи са реактивне на проактивну, превентивну стратегију каква је инактивација/редукција патогена.

Технологије патогене редукције/инактивације имају многоструке, доказане предности:

1. ефективно инактивишу клинички релевантне вирусе, било да су DNK или RNK, са омотачем или без, интраћелијске или екстраћелијске;
2. инактивишу клинички релевантне грам-позитивне и грам-негативне бактерије;
3. инактивишу спирохете, рикеције и протозое значајне за трансфузију;
4. инактивишу лимфоците и тако спречавају болест калем против домаћина удружену са трансфузијом (transfusion-associated graft-versus-host disease engl. TA-GVHD);
5. нуде превентивну заштиту од потенцијално леталних агенаса који ће се неизбежно појавити у будућности.

Постоје, такође, и лоше стране ових технологија које су још увек препрека увођењу у широку примену:

1. смањење приноса третираног продукта, нарочито када су у питању тромбоцити;
2. недовољна инактивација неких вируса без омотача, првенствено вируса хепатитиса А и парвовируса В-19;
3. потенцијална токсичност, мада то није случај са рибофлавином;
4. не постоји још увек један PR/PI систем који би био примењив на све крвне продукте, поготово не за еритроците;
5. висока цена сета за инактивацију (72, 73).

Многобројне студије (35, 69-73) су показале да бенефит превазилази ове недостатке те да би примена технологије инактивације патогена била више него корисна, поготово за пацијенте који су додатно осетљиви из различитих разлога. У такве пацијенте, између осталих, спадају особе са тромботском тромбоцитопенијском пурпуром (ТТП) код којих се ради измена плазме са ЗСП или ЗСП сиромашном у криопреципитату, некада и два пута на дан, а плазма се даје и за надокнаду. Поред њих, ту су и примаоци трансплантата јетре (око 20 јединица ЗСП и 14-21 јединица концентрованих тромбоцита само током трансплантације, и велике количине постоперативно када су ови пацијенти под имуносупресивном терапијом).

У овом тренутку економски није прихватљиво да се инактивишу све јединице било ког хемопродукта, нити је могуће инактивисати довољне количине ЗСП крвне групе „АВ“ као универзално примењиве (најмања заступљеност ове КГ). Решење је инактивисати тражене количине ЗСП одговарајуће крвне групе према потреби болесника (из „ризичних група“) у датом тренутку. На овај начин се такође избегава престаревање инактивисане плазме ако за њом не буде потребе, а такође одбацавање већ третираних јединица које би биле позитивне на маркере ТТ1 који не могу бити урађени у року од осам сати након венепункције за које време треба да се инактивише плазма. Стога, остаје да се утврди да ли накнадна инактивација плазме може неповољно утицати на опоравак протеина плазме, првенствено хемостазних фактора, у односу на „класичну“ претходну инактивацију.

5.1. Утицај накнадне инактивације на протеине и биохемијске параметре

Третирање ЗСП у циљу инактивације патогена као и стандардна манипулација плазме-замрзавање/одмрзавање, различито утичу на концентрације испитиваних биохемијских параметара. Тако долази до благог пораста креатинина, триглицерида, калијума, натријума, аспартат трансминазе и осмотског притиска при чему постоји статистички значајна разлика између крајњих продуката (узорак II) контролне и експерименталне групе код креатинина и AST. Овај пораст је дискретан и нема клинички значај. Лактат дехидрогеназа показује пад у контролној групи током процеса, а пораст у експерименталној и постоји статистички значајна разлика између узорака II између група. Остали испитивани параметри (уреа, укупни билирубин, холестерол, гвожђе, аланин аминотрансфераза и гама-глутамил трансфераза) одржавају исту концентрацију или показују умерен пад током оба начина инактивације, а статистички значајна разлика између узорака II (контролне и експерименталне групе) постоји само код уреје. Како ЗСП није индикована за надокнаду албумина нема ни студија које би се бавиле испитивањем утицаја инактивације патогена на његов садржај. Наша испитивања показују да целокупна манипулација – инактивација, замрзавање/одмрзавање, не утиче на концентрацију албумина те би у случају потребе, накнадно инактивисана плазма у нашем случају, могла да се користи и у ове сврхе.

5.2. Утицај накнадне инактивације на имуноглобулине

Примена реконвалесцентне плазме као извора неутралишућих антитела је данас, у јеку пандемије SARS-CoV 2 вируса веома актуелна. Наиме, како специфична терапија још увек није дефинисана, а планирана вакцинација још није завршена, плазма пацијената излечених од COVID-19 инфекције се намеће као прва линија одбране, нарочито код почетних симптома и болесника са различитим коморбидитетима. Истраживања указују да се ова плазма може користити и у профилактичке сврхе, а заштита може трајати од неколико недеља до неколико месеци (74-77).

Код примене реконвалесцентне плазме кључне су две ствари:

1. За сада не постоји препорука да крв треба тестирати на SARS-CoV 2 јер нема доказа да се он као респираторни вирус може пренети крвљу. Међутим, у неколико случајева тежих болесника плазма је била позитивна на овај вирус и десет дана након појаве симптома (78). Из ових разлога у Wuhan-у је започето тестирање дониране крви real-time PCR методом и утврђено је присуство вирусне RNK код четири асимптоматска донора (79). RB/UV технологија успешно инактивира овај вирус (80).
2. Да би примењена плазма била ефикасна, потребно је да титар неутралишућих антитела буде што виши (77). Ранија испитивања утицаја RB/UV на Ebola вирус, кога успешно инактивираше испод границе детекције, показују да концентрација антитела остаје унутар референтних вредности (50). У погледу инактивација COVID-19 реконвалесцентне плазме различитим PRT, већина студија показује да нема значајног пада концентрације антитела анти-SARS-CoV 2 (81-83). Насупрот томе, Kostin и сар. (65) наводи да је овај пад, ипак, значајно већи код RB/UV у односу на A/UVA и MB, што би се компензовало применом веће количине плазме. Са друге стране, реконвалесцентна плазма садржи различите солубилне факторе за које се очекује да би могли имати повољно дејство на ток болести, као што је AT-III (84) чији је опоравак статистички значајно већи применом наше методе одн. накнадном инактивацијом.

У току нашег испитивања утврдили смо да ниво имуноглобулина пада после примене PRT, а не мења се после замрзавања/одмрзавања, при чему је тај пад највише изражен код имуноглобулина класе G. Утврђено је да постоји статистички значајна разлика у концентрацији између почетног узорка (аутоконтрола) и узорка II, док не постоји значајна разлика између коначних узорака између две групе, што је у складу са наведеним подацима из литературе (50, 81-83).

Укупна активност комплемента CH50, показује константан пад како током процеса претходне, тако и током свих етапа процеса накнадне инактивације (замрзавање/одмрзавање) што је у складу са наводима у литератури (64, 85). Статистички значајна разлика између коначних узорака две групе, не постоји.

Компонента комплемента C3 показује значајнији пораст концентрације од C4 компоненте комплемента. Запажа се да је пораст већи у експерименталној групи (накнадна инактивација), а постоји статистичка значајност између концентрација аутоконтроле и узорка II експерименталне групе, као и између узорака II контролне и експерименталне групе. Пораст концентрације C3 је присутан и у другим студијама (64, 85).

5.3. Утицај накнадне инактивације на факторе коагулације и природне инхибиторе

Свако манипулисање ЗСП, од стајања на ткз. „собној“ температури, преко замрзавања/одмрзавања, а поготово примена хемијских процеса као што је инактивација патогена базирана на фотоинактивацији, утиче на лабилне факторе коагулације. У овом истраживању је забележен пад прокоагулантних фактора како након претходне инактивације што је у складу са истраживањима иностраних научника (36, 55, 64, 86, 87), тако и након накнадне инактивације.

5.3.1. Фактор II

Опоравак FII у различитим студијама се креће од $80 \pm 6\%$ (36, 55, 64, 86) до $87 \pm 5\%$ (87). Слични резултат су добијени и у овој студији, с тим што је опоравак бољи након накнадне инактивације, 81% у односу на 79% после претходне инактивације. Ова чињеница је од изузетног значаја, јер овакве константне вредности неће утицати на терапијске ефекте плазме инактивисане нашом методом.

5.3.2. Фактор V

У англосаксонској литератури се опоравак фактора FV креће од $64 \pm 4\%$ (64), $73 \pm 8\%$ (55), $78,9 \pm 4\%$ (36, 86) до $82 \pm 7\%$ (87). У овој студији опоравак FV након накнадне инактивације износи 81% и бољи је у односу на опоравак од 71% после претходне инактивације. Опоравак фактора V који је за више од 10% већи након инактивације у експерименталној групи, а у сагласности са најбољим резултатима у иностраној литератури, може само ићи у прилог да примењена метода даје изванредне резултате у односу на овај испитивани фактор коагулације.

5.3.3. Фактор VII

У радовима иностраних аутора, опоравак FVII иде од $67\pm 9\%$ (64), $79\pm 4\%$ (86) до $85\pm 7\%$ (87). Опоравак фактора FVII у нашој студији износи 83 % код накнадне инактивације у односу на 75% код претходне. Такође се и код овог значајног фактора коагулације доказује да накнадна инактивација плазме нема битног утицаја на опоравак Фактора VII, а у сагласности је са најбољим резултатима студија англосаксонских аутора.

5.3.4. Фактор VIII

Више аутора детектује опоравак FVIII је од $68,5\pm 3\%$ (86) до $77\pm 9\%$ (36, 55, 64, 87). Резултати у овом истраживању су у складу са добијеним резултатима других истраживача. Наиме, опоравак FVIII након накнадне инактивације је био 71% у односу на 70% после претходне инактивације, што показује да нема статистички значајне разлике у примени методе накнадне у односу на претходну инактивацију.

5.3.5. Фактор IX

Резултати овог истраживања бележе да опоравак FIX након накнадне инактивације износи 72%, а након претходне 77%. Ови резултати су у складу са подацима из иностране литературе где се опоравак FIX креће од $72\pm 5\%$ (55,64) до $82\pm 11\%$ (36, 86, 87). Статистичком анализом није утврђена значајност, па се у терапијској примени накнадно инактивисане плазме, неће очекивати слабији ефекат.

5.3.6. Фактор X

У бројним радовима опоравак фактора X се креће од $75\pm 5\%$ (64) до $85\pm 5\%$ (36, 55, 86, 87), а у нашој студији он износи 65% после накнадне инактивације и 75% после претходне. Поред нижег процента опоравка, није утврђена статистички значајна разлика у односу на обе врсте инактивације плазме, али с обзиром на ниже вредности, код поремећаја коагулације где постоји дефицит фактора X, требало би повећати волумен накнадно инактивисане плазме.

Примарна индикација за примену плазме јесте надокнада фактора коагулације. Када се говори о утицају било какве манипулације (па тако и утицају инактивације патогена) на квалитет плазме, обично је испитивање примарно фокусирано на фактор VIII јер је то најмање стабилан фактор али, заправо, с обзиром на индикације и клиничку ефикасност терапијске плазме, ниво фактора VIII је мање важан. Фактор VIII је реактант акутне фазе и његов ниво у плазми је углавном нормалан или чак и повишен.

Урођени дефицит фактора VIII је узрочник хемофилије А и, за надокнаду овог фактора се све до 50-60. тих година прошлог века (када је идентификован одговорни протеин у оквиру коагулационе каскаде) користила трансфузија крви или плазме. Крајем 1960. године почиње примена криопреципитата са значајно већом концентрацијом овог фактора. Крајем 1990. рекомбинантни фактор VIII улази у широку употребу (88) чиме крипреципитат престаје да се користи за ову индикацију. Једнак пут је прошао и фактор IX, узрочник хемофилије Б.

Протромбин, фактор II, је витамин К зависан фактор коагулације који се синтетише у јетри где су и његове резерве. Под дејством тромбoplastина, у присуству јона

калцијума, од протромбина настаје активни ензим тромбин чијим дејством на фибриноген настаје фибрин.

Дефицит витамина К код одраслих је најчешће последица његове лоше ресорпције из танког црева (опструктивна жутица, инсуфицијенција панкреаса, синдром лоше апсорпције), а ређе неадекватан унос храном, дуготрајна употреба антибиотика са поремећајем синтезе цревних бактерија и губитак резерви витамина К због хепатоцелуларног оштећења. Посебан узрок је прекомерно и неконтролисано узимање оралних антикоагулантних лекова.

За санирање дефицита протромбина услед недостатка витамина К користи се надокнада овог витамина уз терапију основног узрока, а за надокнаду код крварења узрокованог прекомерним узимањем витамин К зависних оралних антикоагуланаса користе се концентрати мултиплих фактора под називом концентрат протромбинског комплекса (Prothrombin complex concentrate – PCC). Постоје две форме овог комплекса: 3F-PCC који садржи факторе II, IX и X и 4F-PCC кога чине фактори II, VII, IX и X (89).

Фактор V је компонента протромбиназа комплекса који убрзава претварање протромбина у тромбин. Дефицит фактора V може бити урођен (веома ретка Owren-ова болест) или стечен (што је још ређе) и резултира повећаним ризиком од крварења (90). Третман ових стања подразумева примену плазме јер концентровани фактор V за сада не постоји. Чешћи поремећај на нивоу фактора V је фактор V Leiden. Код ове мутације гена за фактор V синтетише се протеин који нема места за цепање под дејством протеина C што га чини отпорним на деградацију тако да је у овом случају повећан ризик од тромбозе и у терапији се користе антикоагуланси.

Фактор VII је најосетљивији од свих витамин К зависних фактора коагулације. Део је спољашњег пута активације који започиње када крв (фактор VII) дође у додир са ткивним фактором из оштећеног крвног суда и тако покреће коагулациону каскаду. Урођен дефицит овог фактора је веома редак (Alexander-ова болест) док се стечени дефицит среће код недостатка витамина К. Данас постоји препарат рекомбинантног активираниог фактора VII (rFVIIa) и његова примена је ограничена на неколико индикација: крварење или преоперативна припрема код хемофилије А или В са инхибиторима, урођени дефицит фактора VII и Glanzmann-ова тромбастија рефрактерна на трансфузију тромбоцита.

Фактор X (Stuart–Prower фактор) је витамин К зависан фактор коагулације и синтетише се у јетри. Има централну улогу у коагулационој каскади као место где се сустичу унутрашњи и спољашњи пут коагулације. Активирају га фактор IXa (унутрашњи пут) или фактор VIIa (спољашњи пут) и фактор Xa је главни физиолошки активатор протромбина. Дефицијенција фактора X може бити урођена или стечена. Потпуни недостатак фактора X је инкомпатибилан са животом (91). Његова надокнада код недостатка се постиже применом концентрата фактора X или PCC-а.

У поређењу са другим технологијама инактивације патогена у плазми (MB, A/UVA), које су дуже у употреби те су и боље испитане, студија Соене и сар. (53) показује да је пад прокоагулантних фактора третираних RB/UV већи него код друге две технологије, а до сличног закључка су дошли и Benjamin и McLaughlin (59) што је делом последица и дилуције додатим RB. Међутим, клиничке студије указују на то да је пад активности фактора коагулације унутар прихватљивих граница (92), и да је плазма третирана RB/UV хемостатски компетентна мада су потребне нешто веће количине за постизање истог ефекта (93, 94).

Наша студија, такође, показује пад активности свих фактора коагулације али је проценат опоравка за већину фактора коагулације већи у експерименталној групи, односно када се ЗСП одмах после издвајања замрзне па, након четири месеца у нашем случају, а по потреби у практичној примени, одмрзне и инактивише. Конкретно, опоравак протромбина износи 81% у експерименталној групи у односу на 79% у контролној групи; фактора V: 88% (ЕГ) према 71% (КГ); фактора VII: 83% (ЕГ) према 75% (КГ); фактора VIII: 71% (ЕГ) према 70% (КГ). Бољи опоравак у контролној групи (инактивација по издвајању из целе крви и следствено замрзавање, а одмрзавање након 4 месеца) су показали фактор IX: 77% према 72% у експерименталној групи и фактор X: 75% (КГ) према 65% (ЕГ).

Овакав опоравак фактора коагулације говори у прилог методи накнадне инактивације плазме коју заступамо (табела 1).

За разлику од фактора коагулације, инхибитори су мање подложни и имају бољи опоравак након третмана инактивације патогена.

5.3.7. АТ-III

Опоравак АТ-III је прилично уједначен и креће се око 98% у већини студија (36, 55, 64, 86, 87). И у нашој студији, код накнадне активације опоравак је био 97% у односу на 86% код претходне инактивације што је статистички значајна разлика.

5.3.8. Протеин С

Опоравак РС се у студијама креће од $81\pm 11\%$ (55, 86) до $98\pm 11\%$ (36, 64, 87). У нашој студији, опоравак РС износи 86% код накнадне инактивације у односу на 84% код претходне.

5.3.9. Протеин S

Опоравак PS код различитих аутора износи од $91\pm 9\%$ (55) до $105\pm 12\%$ (36, 64, 86, 87) док је код нас опоравак био 90% у случају накнадне инактивације према 94% код претходне инактивације, али без статистичке значајности.

5.3.10. $\alpha 2$ -AP

Опоравак $\alpha 2$ -AP се у студијама креће од $93\pm 4\%$ (55, 64) до $97\pm 6\%$ (36, 87) док смо у нашој студији имали опоравак $\alpha 2$ -AP 83 % применом методе накнадне инактивације, а 69% код претходне инактивације, а статистичка значајност није утврђена.

Антитромбин III је гликопротеин који се синтетише у јетри и блокира коагулацију на начин да иреверзибилно инактивише различите ензиме коагулационе каскаде, а пре свега фактор Ха и тромбин. Недостатак АТ-III може бити урођен или стечен, квантитативан или квалитативан (95) и повезан је са повећаним ризиком од тромбозе. Стечени недостатак АТ-III је последица повећане потрошње (нпр. DИК, АML), смањене синтезе (нпр. болести јетре) или може бити узрокована применом неких лекова (L-asparaginase, хепарин). За надокнаду постоје два препарата концентрата АТ-III: пулирани лиофилизирани продукт из хумане плазме и рекомбинантни АТ-III добијен од трансгених коза (96). У профилакси и терапији недостатка АТ-III могу се користити и други препарати: хепарин, хепарин мале молекулске тежине (LMWH), индиректни

инхибитори фактора Ха (Fondaparinux), витамин К антагонисти (warfarin, асепосоумарол, ренпросоумон), директни орални антикоагуланси, инхибитори тромбина (Dabigatran) и фактор Ха инхибитори (97).

Протеин С је витамин К зависан антикоагулант, који се синтетише у јетри, а активира га тромбин (98). Активирани протеин С заједно са својим кофактором протеином S, инхибира активирани фактори V и VIII (FVa и VIIIa) и на тај начин смањује продукцију тромбина. Недостатак протеина С повећава ризик од настанка дубоке венске тромбозе. Може бити урођен или стечен. Урођен поремећај је последица мутација *PROC* гена и ако се, у ретким, случајевима, наследи од оба родитеља (хомозигот) може се испољити тежим обликом болести због веома ниског нивоа протеина С. Код благих облика третман није потребан, а код појаве дубоких венских тромбоза у терапији се користе хепарин и варфарин. Хумани концентрат протеина С је тренутно у употреби код пацијената са тешком урођеном дефицијенцијом протеина С у превенцији и третману венских тромбоза и пурпуре фулминанс (99).

Протеин S, такође витамин К зависан антикоагулант, се синтетише у јетри, епителним ћелијама, мегакариоцитима и нервним ћелијама, а у плазми се налази у два облика: везан за регулаторни протеин комплемента C4b-binding protein (C4BP) - 60% и слободан - 40%. PS је првенствено антикоагулантни протеин и као кофактор протеина С инактивише фактор Va у протромбиназа комплексу и фактор VIIIa у теназа комплексу, а има и директан (APC независан) инхибиторни утицај на ове комплексе (100). Недостатак протеина S је ретко наследно обољење са повећаним ризиком венске тромбозе (101). У третману акутног стања се даје хепарин, а након првог тромботског инцидента, варфарин у профилакси. Тренутно не постоји препарат концентрованог протеина S.

Регулатор фибринолизе који се синтетише у јетри је α 2-антиплазмин (уз инхибитор активатора плазминогена и тромбином активирани инхибитор фибринолизе). Циркулише у крви где регулише фибринолизу на три начина: формира комплекс са плазмином; спречава плазминоген да се адсорбује на фибрин; чини фибрин отпорнијим на локални плазмин. Фибринолиза започиње претварањем плазминогена у плазмин и мора бити прецизно регулисана да би се спречило ексцесно крварење и оштећење ткива (102). Код дефицијенције α 2-AP крварење је узроковано прераним растварањем хемостатског чепа, пре него што је репарација ткива и крвних судова завршена те је крварење најчешће одложено. Урођен недостатак α 2-AP је врло ретко обољење, а стечени недостатак се среће код болесника са тешким болестима јетре када ниво у плазми падне испод 8%, а такође и код болести бубрега, дисеминоване интраваскуларне коагулације и пацијената на тромболитичкој терапији (102, 103). У последње време α 2-AP се користи за редукују крварења изазваног тромболитичком терапијом при чему не утиче на тромболизу (104).

Ранија искуства са SD плазмом коришћеном као надокнадна течност током измене плазме у којој је ниво PS и α 2-AP био толико низак да је долазило до венског тромбоемболизма (105), довела су до њеног повлачења из употребе. Међутим, испоставило се да је у питању била само SD плазма америчког произвођача док је европска SD плазма имала задовољавајући ниво ових фактора. Код техника инактивације плазме за појединачне јединице инхибитори коагулације су добро очувани (36, 55, 64, 86, 87).

У нашој студији, опоравак антикоагулантних фактора је добар и у складу је са резултатима из литературе (36, 55, 64, 86, 87). Једино протеин S има бољи опоравак у контролној групи: 97% према 90% у експерименталној групи, док је опоравак свих других антикоагуланаса већи у експерименталној групи: АТ-III 97% (ЕГ) према 86% (КГ), РС 86% (ЕГ) према 84% (КГ) и α 2-АР 83% (ЕГ) према 69% (КГ) (Табела 3). Опоравак АТ-III је значајно већи применом методе накнадне инактивације те тако подржава нашу идеју увођења овог протокола у свакодневну праксу.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Mirasol-PRT има предност у односу на друге PR/PI системе за појединачне јединице јер користи рибофлавин - витамин B2 који је природни нутријент и у примењеној количини није токсичан, те се не мора накнадно отклањати чиме се штеди време и не губи на волумену. Такође, у једном акту може се третирати широк дијапазон запремине плазме (170-360 ml).

1. Квантификавањем биохемијских, хемостазних и имунских параметара Mirasol-PRT, утврдили смо да сем неких биохемијских (креатинин, триглицериди, AST, K, Na, осмотски притисак), долази до пада свих испитиваних параметара у обе групе.
2. Упоредивањем резултата добијених накнадним третирањем плазме са резултатима добијеним стандардним, претходним третирањем плазме утврдили смо да је опоравак протеина у односу на почетне вредности приближно исти у обе групе; да је опоравак имуноглобулина бољи након примене протокола накнадне инактивације; да је опоравак прокоагулантних фактора II, V, VII и VIII бољи након примене протокола накнадне инактивације, а лошији за факторе IX и X; да је опоравак природних инхибитора коагулације бољи након примене протокола накнадне инактивације.
3. Плазма третирана поступком накнадне инактивације задовољава критеријуме за контролу квалитета за инактивисану плазму.
4. Применом протокола накнадне инактивације плазме можемо у датом времену обезбедити потребну количину ЗСП одређене крвне групе, према захтевима са клиника.
5. Применом протокола накнадне инактивације можемо остварити новчану уштеду јер нећемо инактивисати плазму која, потенцијално, неће бити искоришћена и, нећемо инактивисати плазму која би могла бити позитивна на неки од маркера ТТТ.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Nair P, Rendo M, Reddoch-Cardenas K, Burris J, Meledeo M, Cap A. Recent advances in use of fresh frozen plasma, cryoprecipitate, immunoglobulins, and clotting factors for transfusion support in patients with hemathologic disease. *Seminars in hematology*. 2020; 57: 73-82.
2. Harmening D. *Modern Blood Banking & Transfusion Practices*, 6th edition. Philadelphia: Davis Company, 2012. p. 365-367.
3. Fung M. *Technical Manual*, 19 th edition. Bethesda: AABB, 2017. p. 518.
4. Lawless R.A, Holcomb J.B. Plasma Transfusion. *Trauma Induced Coagulopathy*. 2015 Dec 11 : 323–37.
5. Keil S, Ragan I, Yonemura S, Hartson L, Dart N, Bowen R. Inactivation of severe respiratory syndrome coronavirus 2 in plasma and platelet products using a riboflavin and ultraviolet light-based photochemical treatment. *Vox Sanguinis* 2020; 1-7.
6. Brown B, McCullough. Treatment for emerging virusis: Convalescent plasma and COVID-19. *Transfuyion and Apheresis Science*. 2020; 50: 10279.
7. Impact of pathogen-reduction technologies on COVID-19 convalescent plasma potency. Editorial. *Transfusion Clinique et Biologique*. Doi.org/10.1016/j.tracli.2021.02.005.
8. Callum J.L, Karkouti K, Lin Y. Cryoprecipitate: the current state of knowledge. *Transfus. Med. Rev* 2009; 23(3): 177-88.
9. Sorensen B, Bevan D. A critical evaluation of cryoprecipitate for replacement of fibrinogen. *Br J Haematol* 2010; 149(6): 934-43.
10. Benthien Cavichiolo J, Buschlel M, Carvalho B. Comparison of fibrin adhesives prepared by 3 different methods. *Int. Arch. Otorhinolaryngol*. vol.17 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2013.
11. Burnouf T. Modern Plasma Fractionation. *Transfus Med Rev*. 2007 Apr; 21(2): 101–117
12. O’Shaughnessy DF, Atterbury C, Bolton Maggs P, et al. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force. Guidelines for the use of fresh-frozen plasma, cryoprecipitate and cryosupernatant. *Br J Haematol*. 2004; 126: 11–28.
13. Giampaolo A, Barca A, Catalano L, Hassan HJ. Italian National Institute of Health. *Rapporti ISTISAN 04/10*; Proceedings of national meeting on appropriate use of blood; Rome. February 25–26, 2003; Italian National Institute of Health; 2004. pp. 1–186.
14. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A ‘new’ antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965; 191: 541–6.
15. Harrison T. *Desk Encyclopedia of General Virology*. Boston: Academic Press. 2009; p. 455).
16. Howard CR. The Biology of Hepadnaviruses. *Journal of General Virology*. 1986; 67(7): 1215–35.
17. Zarski JP, Ganem D, Wright TL. Hepatitis B virus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical Virology*. Washington, DC: ASM Press; 2002. p. 623–57.
18. Dwyre DM, Holland PV. Hepatitis viruses. In: Barbara JAJ, Regan FAM, Contreras MC, eds. *Transfusion Microbiology*. New York: Cambridge University Press; 2008. p. 9–23.
19. 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*. 2019 Sep; 17(5): 336-346.)
20. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359–62.
21. Quer J, Mur JIE. Hepatitis C virus: epidemiology. In: Thomas HC, Lemon S, Zuckerman AJ, editors. *Viral Hepatitis*. Malden, MA: Blackwell; 2005. p. 407–25.

22. Minz M, Sharma A, Das A, Chawla Y. Impact of anti-hepatitis C virus (HCV) antibody on outcomes in renal transplant recipients infected with HCV. *Transplant Proc.* 2008; 40(7): 2386-8.
23. Garnier, L., Inchauspe, G. and Trepo, C. (2002) Hepatitis C virus. In *Clinical Virology*, eds D.D. Richman, R. J. Whitley, F. G. Hayden, pp. 1153–76. Washington DC, ASM Press.
24. Dow BC, Fiebig EW, Busch MP. Retroviruses. In: Barbara JAJ, Regan FAM, Contreras MC, eds. *Transfusion Microbiology*. New York: Cambridge University Press; 2008. p. 59–65.
25. Adler MW, ABC of AIDS: development of the epidemic. *BMJ* 2001; 322: 1226–9.
26. Busch MP, Operskalski EA, Mosley JW, Lee TH, Henrard D, Herman S, et al. and the Transfusion Safety Study Group Epidemiological background and long-term course of disease in human immunodeficiency virus type 1–infected blood donors identified before routine laboratory skrining. *Transfusion* 1994; 34: 858–64.
27. Pellett PE, Wright DJ, Engels EA, Ablashi DV, Dollard SC, Forghani B, et al. Multicenter comparison of serologic assays and estimation of human herpesvirus 8 seroprevalence among US blood donors. *Transfusion* 2003; 43: 1260–68.
28. Sharp PM, Bailes E, Chaudhuri RR, Rodenburg CM, Santiago MO, Hahn BH, et al. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356: 867–76.
29. Janssens W, Buve A, Nkengasong JN. The puzzle of HIV–1 subtypes in Africa. *AIDS* 1997; 11:705–12.
30. Egglestone SI, Turner AJL. for the PHLS Syphilis Serology Working Group Serological diagnosis of syphilis. *Commun Dis Public Health* 2000; 3: 158–62.
31. Anonymous. Provisional surveillance summary of the West Nile virus epidemic – United States, January–November 2002. *MMWR* 2002; 51: 1129–33.
32. Campbell GL, Martin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:519–29.
33. Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med* 2001; 344: 1807–14.
34. Biggerstaff B.J., Peterson L.R. Estimated risk of West Nile virus transmission through blood transfusion during an epidemic in Queens, New York City. *Transfusion*. 2002; 42: 1019–1026.
35. Alter H. Pathogen Reduction: A Precautionary Principle Paradigm. *Transfusion Medicine Reviews*, Vol 22, No 2 (April), 2008: 97-102
36. Marschner S, Goodrich R. Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets, Plasma and Whole Blood Using Riboflavin and UV Light. *Transfus Med Hemother* 2011; 38: 8–18.
37. Subhashish Das. Pathogen inactivation: prospects and pitfalls. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*. Volume 5 Issue 6.
38. Fast LD, DiLeone G, Li J, Goodrich R. Functional inactivation of white blood cells by Mirasol treatment. *Transfusion* 2006; 46: 642-648.
39. FastLD, DiLeone G, Marschner S. Inactivation of human white blood cells in platelet products after pathogen reduction technology treatment in comparison to gamma irradiation. *Transfusion* 2011; 51: 1397-1404.
40. Yonemura S, Doane1 S, Keil S, Goodrich R, Pidcoke H, Cardoso M. Improving the safety of whole blood-derived transfusion products with a riboflavin-based pathogen reduction technology. *Blood Transfus* 2017; 15: 357-64.

41. Goodrich RP, Doane S, Reddy HL. Design and development of a method for the reduction of infectious pathogen load and inactivation of white blood cells in whole blood products. *Biologicals* 2010; 38: 20–30.
42. Vučetić D, Balint B. Optimizacija skrininga davalaca na markere TTB-od prihvatljivog rizika do maksimalne sigurnosti. *Bilt Transfuziol* 2012; 58(1-2): 72-77.
43. Cicchetti A, Berrino A, Casini M, Codella P, Facco G, Fiore A et al. Health Technology Assessment of pathogen reduction technologies applied to plasma for clinical use. *Blood Transfus* 2016; 14: 287-386.
44. Reikvam H, Marschner S, Apelseth TO, et al. The Mirasol® pathogen reduction technology system and quality of platelets stored in platelet additive solution. *Blood Transfus*. 2010; 8: 186–92.
45. Mundt JM, Rouse L, Van den Bossche J, Goodrich RP. Chemical and Biological Mechanisms of Pathogen Reduction Technologies. *Photochem Photobiol*. 2014; 90(5): 957–964.
46. Pelletier JP, Transue S, Snyder EL. Pathogen inactivation techniques. *Best Pract Res Clin Haematol* 2006; 19: 205–42.
47. Goodrich RP, Platz MS. The design and development of selective, photoactivated drugs for sterilization of blood products; *Drugs Future* 1997; 22: 159–171.
48. Solheim BG, Seghatchian J. Update on pathogen reduction technology for therapeutic plasma: an overview. *Transfus Apher Sci* 2006; 35: 83-90.
49. Kumar V, Lockerbie O, Keil SD, Ruane PH, Platz MS, Martin CB, Ravanat JL, Cadet J, Goodrich RP. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. *Photochem Photobiol* 2004; 80: 15- 21.
50. Cap AP. Treatment of blood with a pathogen reduction technology using UV light and riboflavin inactivates Ebola virus in vitro. *Transfusion*. 2016 Mar; 56(Suppl 1): S6–15.
51. Elikaei A, Hosseini SM, Sharifi Z. Inactivation of model viruses and bacteria in human fresh frozen plasma using riboflavin and long wave ultraviolet rays. *Iran J Microbiol*. 2017 Feb; 9(1): 50-54.
52. Jovic M, Trkuljic M, Jovicic D, Borovcanin N, Balint B. Inactivation efficacy of Mirasol PRT in platelet concentrates using bacteria contamination model. *Vojnosanit Pregl* 2011; 68(12): 1041–6. (Serbian)
53. Coene J, Devreese K, Sabot B, Feys H.B, Vandekerckhove P, Compennolle V. Paired analysis of plasma proteins and coagulant capacity after treatment with three methods of pathogen reduction. *Transfusion* 2014; 54(5): 1321-1331.
54. Gojkov D, Borovčanin N, Vučetić D. Sterility testing of platelets concentrate within quality control: experiences and opportunities to extend the application. In press. DOI: 10.2478/sjccr-2020-0014.
55. Smith J, Rock G. Protein quality in Mirasol pathogen reduction technology-treated, apheresis-derived fresh-frozen plasma. *Transfusion* 2010; 50: 926- 31.
56. Williamson LM, Cardigan R, Prowse CV. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: what is its contribution to blood safety? *Transfusion* 2003; 43: 1322- 9.
57. Rock G. A comparison of methods of pathogen inactivation of FFP. *Vox Sang* 2011; 100: 169- 78.
58. Focosi D., Franchini M. Impact of pathogen-reduction technologies on COVID-19 convalescent plasma potency. *Transfusion Clinique et Biologique* 2021; 28(2): 132-134.
59. Benjamin RJ, McLaughlin LS. Plasma components: properties, differences, and uses. *Transfusion* 2012; 52(s1):9s-19s.

60. Balint B, Jovicic-Gojkov D, Todorovic-Balint M, Subota V, Pavlovic M, Goodrich R. Plasma constituent integrity in pre-storage vs. post-storage riboflavin and UV-light treatment – A comparative study. *Transf Apheres Sci* 2013; 49: 434-439.
61. Di Minno G. Pathogen reduction/inactivation of products for the treatment of bleeding disorders: what are the processes and what should we say to patients? *Annals of Hematology* 2017;96: 1253–1270.
62. Ettinger A, Miklaur MM, Hendrix BK, Bihm DJ, Maldonado-Codina G, Goodrich RP. Quality of proteins in riboflavin and UV light-treated FFP during 1 year of storage at -18°C. *Transfusion and Apheresis Science* 2012; 46: 15–18.
63. Ettinger A, Miklaur MM, Hendrix BK, Bihm DJ, Maldonado-Codina G, Goodrich RP. Protein stability of previously frozen plasma, riboflavin and UV light-treated, refrozen and stored for up to 2 years at -30°C. *Transfusion and Apheresis Science* 2011; 44: 25–31
64. Bihm DJ, Ettinger A, Buytaert-Hoefen KA, Hendrix BK, Maldonado-Codina G, Rock G et al. Characterization of plasma protein activity in riboflavin and UV light-treated fresh frozen plasma during 2 years of storage at -30°C. *Vox Sanguinis* 2010; 98: 108–115.
65. Kostin A.I. et al. Impact of pathogen reduction technologies on immunological properties of the COVID-19 convalescent plasma. *medRxiv* [Preprint] 2020.
66. Roth W.K. History and Future of Nucleic Acid Amplification Technology Blood Donor Testing. *Transfus Med Hemother* 2019; 46: 67–75.
67. Hellstern P, Haubelt H. Manufacture and composition of fresh frozen plasma and virus-inactivated therapeutic plasma preparations: correlation between composition and therapeutic efficacy. *Thrombosis Research* 2002; 107: S3–S8.
68. Balint B, Vucetic D, Todorovic-Balint M, Borovcanin N, Jovanovic-Cupic S, Mandusic V. Safety improving by complementary serological and molecular testing combined with pathogen reduction of the donated blood in window period (Letter). *Transfusion and Apheresis Science* 2013; 49: 103–4.
69. Dong J, Olano J.P, McBride J.W, Walker D.H. Emerging Pathogens: Challenges and Successes of Molecular Diagnostics. *J Mol Diagn.* 2008 May; 10(3): 185–197.
70. Selik R.M., Ward J.W., Buehler J.W. Trends in transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome in the United States, 1982 through 1991. *Transfusion.* 1993;33:890–893.
71. Karin Janetzko Peter Bugert. Pathogen Reduction in Blood Products:What’s Behind These Techniques? *Transfus Med Hemother* 2011; 38:5–6.
72. Magron A, Laugier J, Provost P, Boilard E. Pathogen reduction technologies: The pros and cons for platelet transfusion. *Platelets* 2018 Jan; 29(1): 2-8.
73. Klein H.G, Bryant B. J. Pathogen-reduction methods: Advantages and limits. *Science Series* 2009; 4(1): 154 – 160.
74. Duan K. The feasibility of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients: a pilot study. 2020.
75. Chen L, Xiong J, Bao L, Shi Y. Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. *Lancet Infect Dis* 2020.
76. Mair-Jenkins J, Saavedra-Campos M, Baillie JK, et al. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. *J Infect Dis* 2015;211(1):80–90.
77. Cunningham AC, Goh HP, Koh D. Treatment of COVID-19: old tricks for new challenges. *Crit Care* 2020;24(1):91.
78. Lin Z, Liu S, Liu X, et al. An exceptional peroxide birefringent material resulting from d- π interactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 2020.

79. Le Chang, Lei Zhao, Huafei Gong, Lunan Wang, Lan Wang. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 RNA Detected in Blood Donations. *Emerg Infect Dis.* 2020 Jul;26(7):1631-1633.
80. Ragan I, Hartson L, Pidcoke H, Bowen R, Goodrich R. Pathogen reduction of SARS-CoV-2 virus in plasma and whole blood using riboflavin and UV light. *PLoS One.* 2020; 15(5): e0233947.
81. Tonn T, et al. Stability and neutralising capacity of SARS-CoV-2-specific antibodies in convalescent plasma. *Lancet Microbe* 2020;1:e63.
82. Wendel S, Fontão-Wendel RF, et al. Preservation of Sars-Cov-2 Neutralizing Antibodies (nAb) or Anti-Nucleocapsid Proteins (NP) in Convalescent Donor Plasma (CCP) Treated with Amotosalen/UVA Illumination (A/UVA) (P-LB-22. In: AABB; 2020, virtual meeting.
83. Hueso T, et al. Convalescent plasma therapy for B-cell-depleted patients with protracted COVID-19. *Blood* 2020; 136: 2290–5.
84. Gazzaruso C, et al. Impact of convalescent and nonimmune plasma on mortality of patients with COVID-19: a potential role for antithrombin. *Clin Microbiol Infect* 2020 [S1198-743X(20)30536-X].
85. Reddy HL, Dayan AD, Cavagnaro J, Gad S, Li J, Goodrich RP. Toxicity Testing of a Novel Riboflavin-Based Technology for Pathogen Reduction and White Blood Cell Inactivation. *Transfusion Medicine Reviews* 2008; 22(2):133-153.
86. Hornsey V.S, Drummond O, Morrison A, McMillan L, MacGregor I.R, Prowse C.V. Pathogen reduction of fresh plasma using riboflavin and ultraviolet light: effects on plasma coagulation proteins. *Transfusion* 2009; 49: 2167-2172.
87. Larrea L. The influence of riboflavin photochemistry on plasma coagulation factors. *Transfusion and Apheresis Science* 2009; 41:199–204.
88. Page D. Comprehensive care for hemophilia and other inherited bleeding disorders. *Transfus Apher Sci* 2019; 58(5): 565-8.
89. Baskaran J, Lopez RA, Cassagnol M. Prothrombin Complex Concentrate. Stat-Pearls [Internet] [Last Update: February 5, 2021.], Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2020. Jan-.
90. Vetri D, Lumera G, Tarascio S, et al. A case of acquired factor V deficiency in patient with bleeding. *TH Open* 2020; 4(2): e77-ee9.
91. Dewerchin M, et al. Blood coagulation factor X deficiency causes partial embryonic lethality and fatal neonatal bleeding in mice. *Thromb Haemost* 2000 Feb;83(2):185-90.
92. Goodrich RP. The use of riboflavin for the inactivation of pathogen in blood products. *Vox Sang* 2000;78 (Suppl 2):211-5.
93. Hubbard T, Backholer L, Wiltshire M, Cardigan R, Arien R. Effects of riboflavin and amotosalen photoactivation system for pathogen inactivation of fresh-frozen plasma on fibrin clot structure. *Transfusion* 2016; 56: 41-48.
94. Stanojkovic Z, Balint B, Antic A, Todorovic M, Pavlovic M, Subota V, et al. Clinical efficacy of riboflavin and ultraviolet light inactivated fresh frozen plasma assessed using INR-quantification. *Transf Apher Sci* 2012; 47: 33–7.
95. Găman AM, Găman GD. Deficiency Of Antithrombin III (AT III) - Case Report and Review of the Literature. *Curr Health Sci J.* 2014 Apr-Jun; 40(2): 141–143.
96. Adiguzel C, Iqbal O, Demir M, Fareed J. European community and US-FDA approval of recombinant human antithrombin produced in genetically altered goats. *Clin appl Thromb/Hemostas* 2009; 15(6): 645-51. *Blood* (2019) 134 (26): 2346–2353.
97. Pabinger I, Thaler J. How I treat patients with hereditary antithrombin deficiency.
98. Kroiss S, Albisetti M. Use of human protein C concentrates in the treatment of patients with severe congenital protein C deficiency. *Biologics* 2010; 4: 51-60.

99. Colombo S, Crivellari M, Mucci M, Plumari V, Silvani P, Della Valle P. Human protein C concentrate in a patient with meningitis and bleeding as a complication of treatment with recombinant activated protein C. *Signa Vitae* 2013; 8(1): 62-4.
100. Dahlbäck B. Vitamin K-Dependent Protein S: Beyond the Protein C Pathway. *Semin Thromb Hemost.* 2018; 44(2): 176-184.
101. Fearona A, Pearcey P, Venkataramanb S, ShahbProtein. Protein S Deficiency and Arterial Thromboembolism: A Case Report and Review of the Literature. *J Hematol.* 2019; 8(1): 37-39.
102. Carpenter SI, Mathew P. α 2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilila* 2008; 14(6): 1250-4.
103. Lee KN, Lee CS, Tae WC, Jackson KW, Christiansen VJ, McKee PA. Crosslinking of alpha 2-antiplasmin to fibrin. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 936: 335-9.
104. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Chung KH, McKee PA. Alpha2-antiplasmin:potential therapeutic roles in fibrin survival and removal. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2004; 2(4): 303-10.
105. Leebeek FWG, Schipperus MR, van Vilet HHDM. Coagulation factor levels in solvent/detergent plasma. *Transfusion* 1999; 39: 1150-1.
106. Doyle S, O'Brien P, Murphy K, Fleming C, O'Donnell J. Coagulation factor content of solvent/detergent plasma compared with fresh frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysys* 2003; 14: 283-7.

8. БИОГРАФИЈА

Др Драгана Гојков (рођена Јовичић) је рођена 23. јула 1967. године у Новом Саду. После завршене Основне школе у Сремском Карловцима, уписује Средњу природно-математичку школу „Јован Јовановић Змај“ у Новом Саду, смер биологија, а затим Медицински факултет, такође у Новом Саду. После друге године прелази на београдски Медицински факултет који завршава 1996. године са просечном оценом 8.58. После три године рада као лекар опште праксе у различитим амбулантама, уписује, 2000. специјализацију из Трансфузиологије на Војномедицинској Академији коју завршава 2003. са оценом 5 после чега је постављена на место Начелника Одељења за продукте од крви. Касније је била лекар у том Одељењу, а од 2020. је Начелник Одсека за хематогено трансмисивне вирусне болести.

Докторске академске студије уписује 2008, а усмени докторантски испит полаже 2009. године.

Члан је Лекарске коморе Србије, Српског лекарског друштва (Трансфузиолошка секција) и удружења Анестезија, реанимација, трансфузија (АРТ).

Активно се служи енглеским језиком.

Била је ангажована у мировној мисији MONUSCO у ДР Конго као лекар у тиму за ваздушну евакуацију повређених (АМЕТ) од маја до новембра 2015. године и у мировној мисији MINUSCA у Централноафричкој републици као лекар у Војној болници, од фебруара до септембра 2018. године.

9. БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Jovičić D**, Vučetić D, Balint B, Trkuljić M. Zastupljenost antigena K, k, Fya i Fyb kod vojnika ddk. *Bilt transf*, 48:1-2, 2002, p 35: 100. **(M52)**
2. Ostojčić G, Ljubenov M, **Jovičić D**, Pantelić T, Jevtić LJ, Balint B. Nepovoljni efekti "novije generacije" posredovani alogenim leukocitima i/ili hematopoetskim progenitorima. *Anest Reanim Transf* 2004; 32(1–2): 105–9. **(M53)**
3. **Jovičić D**, Balint B, Trkuljić M. Zastupljenost antigena krvnogrupnih sistema Kell i Duffy u vojnoj populaciji ddk i njihov klinički značaj. *Anest Reanim Transfuziol* 2005; 33(1–2): 69–73. **(M53)**
4. **Jovičić D**, Balint B, Trkuljić M. Koncentrovani trombociti – uticaj izvora na kvalitet hemoprodukta. *Anest Reanim Transfuziol* 2006; 34: 181–5. **(M53)**
5. Trkuljić M, Borovčanin N, Balint B, **Jovičić D**. Testiranje davalaca tehnologijom „Nucleic Acid Testing-NAT“. *Anest Reanim Transfuziol* 2008; 36(1–2): 69–73. **(M53)**
6. Trkuljić M, Borovčanin N, Vučetić D, **Jovičić D**. Transmisivne bolesti-Etiopatogeneza, testiranje na markere, inaktivacija patogena. In: Balint B, Trkuljić M, Todorović M, eds. *Osnovni principi hemoterapije*. Beograd: Čigoja štampa; 2010. p. 421–505. **(M42)**
7. Jocić M, Trkuljić M, **Jovicic D**, Borovčanin N, Balint B. Mirasol PRT inactivation efficacy evaluated in platelet concentrates by bacteria-contamination model. *Vojnosanit Pregl* 2011;68(12): 1041–6. **(M23)**
8. **Jovičić D**, Vučetić D, Borovčanin N, Jocić M, Balint B. Iznalaženje optimalne sile centrifugiranja u procesu pripreme koncentrovanih trombocita iz buffy coat-a. *Bilt Transfuziol* 2011; 56: 56–63. **(M52)**

9. Borovčanin N, Vučetić D, Stamenković G, Jocić M, **Jovičić D**, Balint B. Principi NAT tehnologije sa osvrtom na rezultate Instituta za transfuziologiju VMA u periodu od 2007. Do 2011. godine. Bilt Transfusiol 2011; 57(1-2): 99–107. (M52)
10. Balint B, Todorović M, Vučetić D, **Jovičić D**, Jocić M, Subota V, Mijušková Z. Comparative effectiveness of prestorage vs. poststorage riboflavin and ultraviolet–light treatment on the quantity and functionality of fresh frozen plasma constituents. Vox Sang 2011; 101(Suppl. 2): 77. (M34)
11. Balint B, **Jovicic D**, Todorovic M, Subota V, Pavlovic M, Goodrich R. Plasma constituent integrity in pre–storage vs. post–storage riboflavin and UV–light treatment – a comparative study. Transf Apher Sci 2013; 49: 434–9. (M23)
12. Vucetic D, Balint B, Ljubenov M, Borovcanin N, **Jovicic D**. Recommendation of a New Cofirmatory Algorithm and Signal-To-Cut off Ratio for HCV Testing of Donated Blood (Meeting Abstract). Vox Sanguinis 2013; 105(1): 181. (M22)
13. **Jovičić–Gojkov D**, Vučetić D, Balint B. Ispitivanje sterilnosti koncentrovanih trombocita u okviru kontrole kvaliteta: iskustva i mogućnost proširenja primene. Bilt Transfusiol 2014; 59: 14–9. (M53)
14. **Gojkov D**, Todorović–Balint M, Ljubenov M, Jocić M, Pejović J, Balint B. Ispitivanje konstituenata u plazmi inaktivisanoj pomoću riboflavina i UV–zračenja. Anest Reanim Transfusiol 2014; 41(1–2): 27–31. (M53)
15. **Gojkov D**, Todorovic-Balint M, Kanjuh V, Vucetic D, Pavlovic M, Balint B. Extended platelet concentrate storage/practice – a model based on the rationalized microbial monitoring. Transfus Apher Sci. 2015; 53: 82–84. (M23)
16. Vučetić D, Balint B, Ostojić G, Ljubenov M, **Jovičić-Gojkov D**. Savremeni kriterijumi za izbor davalaca krvi/hemoprodukata. Anest Reanim Transfusiol 2015; 42(1–2): 49–56. (M53)
17. Ostojić G, Ljubenov M, Obradović D, Todorović-Balint M, **Jovičić-Gojkov D**, Balint B. Terapijske izmene plazme u lečenju imunoneuroloških bolesnika. Anest Reanim Transfusiol 2015; 42(1–2): 57–62. (M53)
18. **Jovičić-Gojkov D**, Ostojić G, Todorović-Balint M, Vučetić D, Rafajlovski N, Balint B. Inaktivacija/redukcija patogena u krvi/hemoproduktima. Anest Reanim Transfusiol 2015; 42(1–2): 63–70. (M53)
19. **Jovičić Gojkov D**, Todorović Balint M, Vučetić D, Balint B. Inovativna paradigma bezbedne hemoterapije : Inaktivacija/redukcija patogena – za i protiv. Bilt Transfusiol 2016; 62: 5–8. (M52)
20. Šerbić Nonković O, Kuzmanović M, Životić M, S Žunić M, **Jovičić Gojkov D**, Vujić D. Independent role of interleukin-6 and interleukin-8 in the etiology of transfusion reactions to platelet concentrates in children. Vojnosanit Pregl 2018; 75(4): 390–397. (M23)
21. **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)
22. **Gojkov D**, Balint B, Dejanović B, Vučetić D. Influence of riboflavin and uv-light treatment on plasma’s protein protein s and α 2-antiplasmin; the matter of time. Vojnosanit Pregl. DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP210315051G>. 2021. (M23)
23. Ostojic G, Supic G, Karlicic V, Karlicic M, Ristanovic E, Kovacevic M, Abazovic Dz, **Gojkov D**, Stanojevic I, Vukosavljevic M, Danilo V. Novel protocol for selection of SARS-COV2 convalescent plasma. Vojnosanit Pregl. DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP201009129O>. 2021 (M23)

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Драгана Гојков, изјављујем да докторска дисертација под насловом: УТИЦАЈ ТЕРМИНА ИНАКТИВАЦИЈЕ ПАТОГЕНА ПРИМЕНОМ РИБОФЛАВИНА И УЛТРАВИОЛЕТНОГ ОЗРАЧЕЊА НА ИНТЕГРИТЕТ КОНСТИТУЕНАТА ПЛАЗМЕ У ЗАМРЗНУТОЈ СВЕЖОЈ ПЛАЗМИ која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Београду, 7. јула 2021. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Драгана Гојков,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом: УТИЦАЈ ТЕРМИНА ИНАКТИВАЦИЈЕ ПАТОГЕНА ПРИМЕНОМ РИБОФЛАВИНА И УЛТРАВИОЛЕТНОГ ОЗРАЧЕЊА НА ИНТЕГРИТЕТ КОНСТИТУЕНАТА ПЛАЗМЕ У ЗАМРЗНУТОЈ СВЕЖОЈ ПЛАЗМИ која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

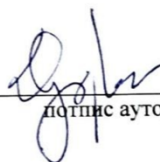
не дозвољавам¹

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

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

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

У Београду, 7. јула 2021. године



потпис аутора

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