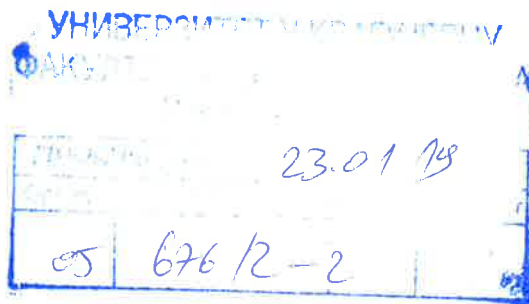


УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ



1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број IV-03-1005/22 од 11.12.2018. године, именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата **Небојше Вацића** под називом:

**“Функционално испитивање концентрата тромбоцита припремљених
из „buffy coat“-а“**

На основу одлуке Већа за медицинске науке, формирана је комисија у саставу:

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник;
2. **Доц. др Светлана Ђукић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Интерна медицина*, члан;
3. **Доц. др Миодраг Вучић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област *Интерна медицина-хематологија*, члан;

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи

ИЗВЕШТАЈ

Кандидат **Небојша Вацић** испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

2.1. Кратка биографија кандидата

Небојша Ваџић рођен је 11.06.1964. године у Нишу, Србија. Завршио је основну школу "Ратко Вукићевић" и средњу медицинску школу "Др Мленко Хаџић" у Нишу. Вишу медицинску школу завршио је у Ћуприји, а Основне струковне студије, као и специјалистичке струковне студије, завршио је на Медицинском факултету Универзитета у Нишу. Основне академске студије, Оперативно примењени менаџмент, завршио је на Факултету за менаџмент малих и средњих предузећа у Београду.

Мастер академске студије, Менаџмент у здравству, завршио је на Факултету за примењени менаџмент, економију и финансије „МЕФ“- Београд, Универзитета Привредна академија Нови Сад.

2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов: “Функционално испитивање концентрата тромбоцита припремљених из „*buffy-coat*“-а“

Предмет: Испитивање квалитета концентрата тромбоцита добијених издвајањем из “*buffy-coat*“-а одређивањем хематолошких параметара (број тромбоцита, број резидуалних леукоцита и еритроцита), гасних анализа (pO_2 , pCO_2) и биохемијских *in vitro* параметара (рН, глукоза, LDH, лактати) првог, трећег и петог дана складиштења, стерилности концентрата тромбоцита током целог периода складиштења, као и агрегације тромбоцита као мере њихове функционалности (методом импедантне агрегометрије).

Хипотезе:

- У условима адекватног складиштења, смањује се број тромбоцита у припремљеним концентратима, али је до краја складиштења тај број у оквиру прописаних параметара контроле квалитета;
- Концентрати тромбоцита задржавају минималан број леукоцита у свом саставу, што смањује ризик трансфузијских реакција;
- Постоје биохемијске промене у припремљеним концентратима тромбоцита са последичним променама интрацелуларног метаболизма, које се огледају у промени рН, pO_2 и pCO_2 ;

- Концентрати тромбоцита задржавају стерилност до краја рока складиштења, како на присуство аеробних, тако и анаеробних бактерија;
- Постоји смањење тромбоцитне функције у припремљеним концентратима током складиштења, али тромбоцити задржавају своју функцију тј. одређени степен агрегације све до петог (последњег) дана складиштења.
- Примена концентрата тромбоцита који су складиштени у прописаним условима је ефикасна и безбедна током целог рока чувања тромбоцита;
- У циљу побољшања квалитета концентрата тромбоцита важно је складиштити их у прописаним условима и издвојити све факторе који могу бити од значаја за промену квалитета продукта.

2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације

Кандидат, Небојша Вацић, је објавио рад у целини у часопису категорије M23, у коме је први аутор, чиме је стакао услов за пријаву теме докторске дисертације.

1. **Vacić N, Antić A, Stanojković Z, Vučić M, Lazarević M.** Biochemical and functional quality assessment of platelet concentrates. *Vojnosanit Pregl.* 2018; doi: 10.2298/VSP180226059V **M23**

2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Трансфузија концентрата тромбоцита се примењује у превенцији и лечењу крварења код болесника са тромбоцитопенијом или тромбоцитопатијом. Најчешће се примењује у лечењу хематолошких болести, код пресађивања коштане сржи и других органа, у лечењу кардиохируршких болесника и при гастроинтестиналним крварењима. Повећање примене агресивних медицинских поступака и хемиотерапије повећава учесталост лечења трансфузијама тромбоцитних концентрата. Савремени подаци показују да се годишње трансфундује око 1,5 милиона тромбоцитних концентрата у Америци и око 2,9 милиона у Европи.

Тромбоцити представљају компоненту добијену из јединице целе крви (припремом из плазме богате тромбоцитима (*platelet rich plasma-PRP*) или “*buffy-coat*”-а (слој леукоцита и тромбоцита, настао после седиментације еритроцита)) или тромбоцитаферезном процедуром помоћу аутоматског сепаратора крвних ћелија

(аферезни тромбоцити). Припрема концентрата тромбоцита из јединице целе крви је метода условљена великим бројем фактора који појединачно или удружено могу имати значајан утицај на квалитет коначног производа, те је врло тешко стандардизовати концентрате тромбоцита. Најзначајнији међу факторима су врста и квалитет кеса за узимање крви, карактеристике центрифугирања, начин сепарације и услови складиштења припремљених концентрата тромбоцита. Данас у свим развијеним земљама света, укључујући и нашу, концентрати тромбоцита се припремају уклањањем "buffy-coat"-а слоја, а њихов квалитет је посебно побољшан уколико се крв узима у такозване „top and bottom" кесе за прикупљање крви. Тромбоцити се чувају у посебним пластичним кесама за складиштење које омогућавају транспорт кисеоника, на температури од $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ уз константно мешање на хоризонталном агитатору (приближно 70 циклуса/мин) најдуже 5 дана. Рок чувања се може продужити до седам дана применом неке од метода инактивације патогена у концентрате тромбоцита.

2.5. Значај и циљ истраживања

Значај истраживања се огледа у потенцијално новим сазнањима о квалитету концентрата тромбоцита добијених издвајањем из "buffy-coat"-а, чиме би се прилагодила њихова терапијска примена .

Циљ ове студије би био да испита квалитет концентрата тромбоцита добијених издвајањем из "buffy coat"-а одређивањем хематолошких параметара (број тромбоцита, број резидуалних леукоцита и еритроцита), гасних анализа и биохемијских *in vitro* параметара (рН, глукоза, LDH, лактати) првог, трећег и петог дана складиштења. У складу са овим општим циљем постављени су и следећи специфични циљеви:

1. испитати стерилност концентрата тромбоцита добијених издвајањем из "buffy coat"-а током целог периода складиштења;
2. испитати степен агрегације тромбоцита у концентратима тромбоцита припремљеним из "buffy coat"-а методом импедантне агрегометрије;
3. на основу добијених резултата утврдити да ли су припремљени концентрати тромбоцита добијени издвајањем из "buffy coat"-а сагласни са критеријумима Водича Савета Европе;

4. утврдити факторе побољшања и стандардизације квалитета концентрата тромбоцита добијених издвајањем из “*buffy coat*”-а.

2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Стандардна терапијска доза тромбоцита за одрасле је припремљена из 4-6 јединица крви, те се концентрати тромбоцита могу да трансфундују као појединачни или се даље, због лакше администрације, пулирају ланчаном методом или коришћењем комерцијалног кита за пулирање у једну кесу као терапијска доза. Током пулирања може да се користи и леукоцитни филтер и тако припреме филтрирани (леуко-редуковани) пулирани концентрати тромбоцита.

Квалитет концентрата тромбоцита одређен је критеријумима дефинисаним у Водичу за припрему, коришћење и обезбеђење квалитета Савета Европе Европског комитета за трансфузију крви (19. издање, 2017), који је прихваћен од стране Министарства здравља Републике Србије. Обавезни захтеви контроле квалитета концентрата тромбоцита припремљених из “*buffy-coat*”-а подразумевају:

- запремину концентрата тромбоцита > 40 мл која садржи најмање 60×10^9 тромбоцита,
- мање од $0,05 \times 10^9$ леукоцита,
- број еритроцита $0,2 - 1 \times 10^9$
- рН већи од 6,4.

Просечни волумен концентрата тромбоцита је 50 – 60 ml, док је просечни волумен терапијског пула тромбоцита 240 – 360 ml. Осим тога, препоручено је испитивање бактериолошке исправности концентрата тромбоцита, као и испитивање функције тромбоцита у припремљеним концентратима, што најчешће подразумева испитивање агрегације тромбоцита додавањем одговарајућих агониста.

2.7. Методе истраживања

2.7.1. Врста студије

Истраживање је дизајнирано као експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*. Да би се реализовало истраживање добијена је сагласност Етичког одбора Клиничког центра у Нишу и Завода за трансфузију крви Ниш.

2.7.2. Популација која се истражује

Истраживање ће обухватити испитивање квалитета 80 концентрата тромбоцита припремљених у Заводу за трансфузију крви у Нишу, према стандардној процедури припреме тромбоцита из “buffy coat”-а. Концентрати тромбоцита биће припремљени из јединица целе крви добровољних давалаца крви оба пола, нереактивних на маркере трансмисивних болести, уредних лабораторијских и хематолошких параметара, који нису узимали антиагрегацијске лекове уназад 7 дана од давања крви. Из истраживања ће бити искључени хилозни или хемолизирани концентрати.

2.7.3. Узорковање

Ово испитивање састојаће се из:

1. Припреме концентрата тромбоцита из јединица крви добровољних давалаца издвајањем из “*buffy-coat*”-а,
2. Испитивања хематолошких параметара квалитета концентрата тромбоцита,
3. Испитивања биохемијских *in vitro* параметара квалитета концентрата тромбоцита,
4. Испитивања агрегабилности тромбоцита у концентрата тромбоцита,
5. Испитивања стерилности концентрата тромбоцита.

2.7.4. Варијабле

Крв од добровољних давалаца прикупљаће се у систем четвороструких пластичних кеса које садрже 63 мл антикоагулантног раствора CPD и 100 ml адитивног раствора за складиштење еритроцита SAGM (*Jiaying Tiahne Pharmaceutical*). Све јединице крви у испитивању биће складиштене на собној температури (20-24°C) и у року од 6 сати од колекције центрифугираће се 15 минута на 3200 обртаја и температури од 22°C

(центрифуге за крв са хлађењем, *Heraus, Cryofuga 8500i*), а затим ће бити вршена аутоматска сепарација на апаратима *T-ACE II (Terumo)*. На тај начин из сваке јединице целе крви биће произведени концентрат еритроцита, јединица плазме и тромбоцитно-леукоцитни слој – „*buffy coat*“, који ће бити остављен да стоји на собној температури два сата. Након тога „*buffy coat*“ ће бити центрифугирани 8 минута на 1100 обртаја и температури од 22°C, концентрати тромбоцита даље пребачени у кесе које омогућавају чување тромбоцита до пет дана, оставиће се кратко време на равној површини (како би тромбоцити дезагрегирани), етикетирће се (ISBT 128) и складиштити хоризонтално на агитатору (*Teknolabo Instruments, Italy*) до истека рока складиштења (5 дана).

Квалитет концентрата тромбоцита биће процењен на основу запремине продукта и параметара испитивања из узорака концентрата тромбоцита. Из испитивања ће бити искључени концентрати тромбоцита запремине мање од <20% стандардне запремине продукта, хилозни, хемолизирани и на било који начин контаминирани концентрати тромбоцита.

Из сваког концентрата тромбоцита биће узета по три узорка, и то првог (КТ1), трећег (КТ3) и петог дана складиштења (КТ5). Узорци КТ1 чиниће контролну групу (КГ), док ће КТ3 и КТ5 чинити испитивану групу (ИГ3 и ИГ5). Из свих узорака концентрата тромбоцита биће одређивани следећи параметри:

-хематолошке анализе – концентрација тромбоцита, резидуалних еритроцита и леукоцита на апарату *Abbott Cell-Dyn Ruby (Abbott Laboratories)*,

-гасне анализе– pO_2 , pCO_2 на апарату *AVL Compact 3 Blood Gas Analyzer (Roche Diagnostics)*,

-pH - на апарату *CyberScan pH510 (Eutech Instruments, Holandija)*,

-бактериолошка исправност тромбоцита - на апарату *BacT/ALERT 3D (Biomérieux, Француска)*: испитивани узорци се засејавају у по једну бочицу за аеробне (BPN) и једну за анаеробне бактерије (BPA). Засејане подлоге у бочицама се инкубирају 7 дана на 37°C. Сензор у систему детектује промене боје специфично дизајнираних подлога, осетљивих на промену концентрације угљен-диоксида. Ако бактерије расту, повећана је концентрација угљен диоксида која доводи до промене боје на бази бочице, а то систем детектује и сигнализира звучним и визуелним сигналом.

-агрегација тромбоцита – методом импедантне агрегометрије на апарату (*Multiplate analyzer, Dynabite medical*, Немачка): метода мери агрегацију тромбоцита који су *ex vivo* стимулирани применом различитих тромбоцитних агониста (аденозин дифосфат, арахидонска киселина, колеган). Мултиплате тест ћелије имају две независне мерне јединице, од којих је свака састављена од две бакарне, сребром обложене електроде висине 3,2 mm и дијаметра 0,3 mm. Процедура подразумева мешање 150µl концентрата тромбоцита са 450 µl пуфера (0,81% NaCl, 0,0067 M PO₄, pH=7,2) у одговарајућој тест ћелији. Након инкубације на 37°C у трајању од три минута додаје се 20 µl изабраног агониста, и то 3,2; 6,4 и 9,6 µg колагена/ml. Узорак крви са додатим агонистом се аутоматски меша (800 U/мин) коришћењем магнетне мешалице обложене поли-тетрафлуоро-етиленом (PTFE). Активирани тромбоцити адхерирају на електроде и појачавају електричну импеданцу између њих која се региструје у току 6 минута, а пораст импеданце се преводи у произвољне агрегацијске јединице (*arbitrary aggregation units (AU)*). Најважнији параметри који се прате у току тестирања на *Multiplate analyzer*-у јесу: површина испод агрегацијске криве (AUC), која је директно зависна од висине криве, а показује укупну активност тромбоцита, висина агрегацијске криве, која показује степен агрегације тромбоцита и максимални нагиб агрегацијске криве, који показује брзину агрегације тромбоцита.

2.7.5. Снага студије и величина узорка

Студијски узорак је израчунат узимајући α као 0.05 и снагу студије од минималних 0.8 за двострани *Student's t* тест (понављана мерења) испитујући осам параметара код исте групе испитаника у два тренутка времена, у првом и трећем дану, а потом у првом и петом дану испитиваног периода, према статистичком програму *G*Power3*. С обзиром да не постоје подаци о свим испитиваним вредностима у досадашњој литератури, за величину ефекта узимамо препоручену вредност (средња величина ефекта = 0,5). Утврђени број узорака износи 34. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (*Student's t* тестом за два поновљена мерења или *Wilcoxon*-овим тестом) са снагом студије $\geq 80\%$.

2.7.6. Статистичка обрада података

Сви добијени подаци биће сређени и статистички обрађени коришћењем статистичког софтвера SPSS, верзија 16. Резултати ће бити приказани табеларно и графички. Континуалне варијабле ће бити представљене аритметичком средином, стандардном девијацијом (SD) и медијаном (Me). Квалитативна обележја испитиваних променљивих биће приказана учесталашћу (N) и процентуално (%). Нормалност дистрибуције континуалних варијабли, у зависности од величине узорка, испитиваће се *Kolmogorov-Smirnov* или *Shapiro-Wilk*-овим тестом. Тестирање значајности разлике у оквиру група за поновљена мерења вршиће се *Student t*-тестом упарених узорака за нормалну, односно *Wilcoxon Signed Ranks* тестом за варијабле чија дистрибуција одступа од нормалне. За тестирање статистичке значајности разлика апсолутних фреквенција између узорака користиће се *Pearson*-ов χ^2 тест, или *Fisher*-ов тест егзактне вероватноће. Ефекат различитих концентрација на промене праћених варијабли током времена утврдиће се анализом варијансе за поновљена мерења (RM ANOVA).

2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

Очекује се да ће истраживање показати да концентрати тромбоцита припремљени из јединица целе крви добровољних давалаца издавањем из „*buffy coat*“-а задржавају све карактеристике одређене Препорукама за припрему, употребу и обезбеђење квалитета компонената крви Савета Европе, те да се могу безбедно применити у рутинској трансфузиолошкој пракси током целог периода складиштења.

Одржавање броја тромбоцита у концентратима тромбоцита је од есенцијалног значаја за ефикасност трансфузије. Већи број тромбоцита у концентратима доводи до веће клиничке ефикасности трансфузије тромбоцита, постоји већи коригован принос тромбоцита (CCI) код пацијената, што смањује укупан број трансфундованих концентрата тромбоцита који су потребни за заустављање крварења односно повлачења симптома тромбоцитопеније у клиничкој слици и повећање броја тромбоцита код пацијента. Смањење броја трансфузија са своје стране смањује ризик алоимунизације на антигене HLA или HPA система, инциденцу посттрансфузијских реакција, скраћује дужину и укупне трошкове болничког лечења.

Посебно је значајно доказати ниску концентрацију леукоцита у концентратима тромбоцита која се повезује са смањењем инциденце посттрансфузијских реакција (фебрилна нехемолитичка трансфузијска реакција (FNHTR), акутно оштећење плућа изазвано трансфузијом (TRALI), рефрактарност на трансфузије тромбоцита, болест калема против домаћина (GvHD)) и трансмисије патогених чинилаца, пре свега CMV. Очекује се да ће се број леукоцита одржавати у границама референтних граница, као и да ће концентрати тромбоцита задржати стерилност све до краја складиштења.

С друге стране, очекује се да ће током периода складиштења доћи до пада у концентрата тромбоцита, али ће се вредности и даље кретати у границама референтног опсега. Пад рН је последица појачане гликолитичке активности тромбоцита и удружен је са променом облика тромбоцита (дискоидни прелази у сферичан) и значајним губитком њихове одрживости и *in vivo* опоравка. Такође се очекује поремећај на нивоу pO_2 и pCO_2 трећег и петог дана складиштења, што је последица повећане гасне пермеабилности пластичних кеса у којима се чувају концентрати тромбоцита, посебно за CO_2 .

2.9. Оквирни садржај докторске дисертације

Фокус овог испитивања биће на испитивању функције тромбоцита мерењем агрегације тромбоцита у концентратима. Очекује се да се током периода складиштења концентрата тромбоцита агрегабилност тромбоцита смањује, и то статистички значајније додавањем веће концентрације агониста (6,4 и 9,6 μg колагена/ml), што ће бити последица пада рН и метаболичких промена у виду повећања концентрације лактата и промена у структури мембране тромбоцита.

У светлу свих насталих промена током периода складиштења очекује се издвајање фактора који су од значаја за смањење степена тих промена и побољшање квалитета концентрата тромбоцита, посебно од трећег до петог дана складиштења.

3. Предлог ментора

За ментора ове докторске дисертације се предлаже проф. др Небојша Анђелковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина.

Проф. др Небојша Анђелковић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и испуњава услове за ментора докторских дисертација у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

3.1 Компетентност ментора

Радови проф. др Небојше Анђелковића који су у вези са темом докторске дисертације:

1. Popovic S, Jovanovic D, Mihaljevic B, **Andjelkovic N**, Marjanovic G, Marisavljevic D, Vlaisavljevic N, Popovic L, Salma S, Agic D, Milosevic R, Smiljanic M, Sretenović S, Djurdjević P, Markovic O, Hajder J, Govedarovic N. Rituximab in the therapy of stage III and IV follicular lymphoma: Results of the REFLECT 1 study of the Serbian Lymphoma Group. J BUON. 2017;22(2):487-494.
2. Ignjatovic V, Pavlovic S, Miloradovic V, **Andjelkovic N**, Davidovic G, Djurdjevic P, Stolic R, Iric-Cupic V, Simic I, Ignjatovic VD, Petrovic N, Smiljanic Z, Zdravkovic V, Simovic S, Jovanovic D, Nesic J. Influence of Different β -Blockers on Platelet Aggregation in Patients With Coronary Artery Disease on Dual Antiplatelet Therapy. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2016;21(1):44-52.
3. Jovanovic D, Djurdjevic P, **Andjelkovic N**, Zivic L. Possible role of CD22, CD79b and CD20 expression in distinguishing small lymphocytic lymphoma from chronic lymphocytic leukemia. Contemp Oncol (Pozn). 2014;18(1):29-33.
4. Vujanac A, Jakovljevic V, Djordjevic D, Zivkovic V, Stojkovic M, Celikovic D, **Andjelkovic N**, Skevin AJ, Djuric D. Nitroglycerine effects on portal vein mechanics and oxidative stress in portal hypertension. World J Gastroenterol. 2012;18(4):331-9.
5. Koprivica Z, Djordjevic D, Vuletic M, Zivkovic V, Barudzic N, **Andjelkovic N**, Djuric D, Iric-Cupic V, Krkeljic J, Jakovljevic V. Von Willebrand factor and oxidative stress parameters in acute coronary syndromes. Oxid Med Cell Longev. 2011;2011:918312.
6. Raicević S, Cubrilo D, Arsenijević S, Vukcević G, Zivković V, Vuletić M, Barudzić N, **Andjelković N**, Antonović O, Jakovljević V. Oxidative stress in fetal distress: potential prospects for diagnosis. Oxid Med Cell Longev. 2010;3(3):214-8.

4. Научна област дисертације

Медицина. Изборно подручје: Клиничка и експериментална интерна медицина

5. Научна област чланова комисије

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник;
2. **Доц. др Светлана Ђукић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Интерна медицина*, члан;
3. **Доц. др Миодраг Вучић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област *Интерна медицина-хематологија*, члан;

ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу досадашњег научно-истраживачког рада кандидат, Небојша Вацић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације. Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

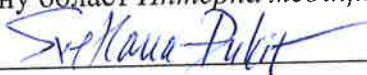
Комисија предлаже Научно-наставном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата Небојше Вацића, под називом **“Функционално испитивање концентрата тромбоцита припремљених из „buffy coat“-а “** и одобри њену израду.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник



Доц. др Светлана Ђукић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Интерна медицина*, члан



Доц. др Миодраг Вучић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област *Интерна медицина-хематологија*, члан



У Крагујевцу, 09.01.2019. године