



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊА ЛУЦИ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ БАЊА ЛУКА  
Образац -3

Примљено: 11.9.2017.		
Орг. јед.	Број	Прилог
R/14.107/17		

**ИЗВЈЕШТАЈ**  
*о оцјени урађене докторске дисертације*

**I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ**

Наставно-научно вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бања Луци, на VIII редовној сједници одржаној 31.08.2017. године донијело је Одлуку број: 18/3.574/2017. о именовању Комисије за оцјену и одбрану урађене докторске дисертације mr.сци др Гордане Гузијан, под насловом „*Молекуларна дијагностика варијанти слабијег облика антитела D у популацији давалаца крви Републике Српске*“.

Именована комисија у саставу:

1. Проф др Милан Скробић  
Звање: ванредни професор  
Ужа научна област: Нуклеарна медицина  
Институција: Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци  
Предсједник;
2. Проф др Драгомир Марисављевић  
Звање: редовни професор  
Ужа научна област: Интерна медицина  
Институција: Медицински факултет Универзитета у Београду  
Ментор и члан;
3. Проф др Предраг Грубор  
Звање: редовни професор  
Ужа научна област: Хирургија  
Институција: Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци  
члан;
4. Доц.др Лана Нежић  
Звање: доцент  
Ужа научна област: Фармакологија и токсикологија  
Институција: Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци  
Члан;
5. Доц. др Славко Манојловић  
Звање: доцент

Ужа научна област: Хирургија

Институција: Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци

Члан;

Након детаљног прегледа урађене докторске дисертације кандидата мр.сци др Гордане Гузијан, чланови Комисије подносе Научно-наставном вијећу Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци и Сенату Универзитета у Бањој Луци извјештај:

- 1) Навести датум и орган који је именовао комисију;
- 2) Навести састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, научно-наставног звања, назива у же научне области за коју је изабран у звање и назива универзитета/факултета/института на којем је члан комисије запослен.

## II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

1. Гордана (Ненад) Гузијан
2. 18.02.1961.год. Бања Лука , Република Српска, Босна и Херцеговина
3. Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет у Бањој Луци, Студијски програм медицина, доктор медицине;  
Послиједипломски студиј на Медицинском факултету у Бања Луци Универзитета у Бањој Луци
4. Медицински факултет у Бања Луци, Магистарска теза под називом: „Дистрибуција клинички значајних еритроцитних антигена у популацији давалаца крви Републике Српске“ научна област Медицина/Хирургија одбрањена 20.11.2014.год.
5. Магистар медицинских наука, научна област Медицина/Хирургија.

- 1) Име, име једног родитеља, презиме;
- 2) Датум рођења, општина, држава;
- 3) Назив универзитета и факултета и назив студијског програма академских студија II циклуса, односно послиједипломских магистарских студија и стечено стручно/научно звање;
- 4) Факултет, назив магистарске тезе, научна област и датум одbrane магистарског рада;
- 5) Научна област из које је стечено научно звање магистра наука/академско звање мастера;
- 6) Година уписа на докторске студије и назив студијског програма.

## III УВОДНИ ДИО ОЦЛЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

- 1) Наслов докторске дисертације мр.сци др Гордане Гузијан је „Молекуларна дијагностика варијанти слабијег облика антигена D у популацији давалаца крви Републике Српске“.
- 2) Тема докторске дисертације је прихваћена од стране Наставно-научног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци Одлуком број:18/3.343/2016 од 11.05.2016.год. Сенат Универзитета у Бањој Луци Одлуком број:02/04-3.1589-88/16 од 23.06.2016.год. дао је сагласност на Извјештај о оцјени подобности теме за израду докторске дисертације на Медицинском факултету у Бањој Луци кандидата мр.сци др Гордане Гузијан под називом „Молекуларна дијагностика варијанти слабијег облика антигена D у популацији давалаца крви Републике Српске“.
- 3) Садржај докторске дисертације је изложен у следећим поглављима:  
a) Увод (странице 1-39);

- б) Циљеви истраживања (страна 40);
- в) Радна хипотеза (страна 41);
- г) Испитаници, материјали и методи (стране 42-82);
- д) Резултати (странице 83-107);
- ђ) Дискусија (странице 108-122);
- е) Закључци (странице 123-124);
- ж) Литература (странице 125-139);
- з) Прилози (140-155).

Рукопис ове докторске дисертације написан је латиничним писмом, фонтом Times New Roman, величина слова је 12, а садржи укупно 155 страница формата А4, 21 слику, 40 табела и 5 прилога. На почетку рукописа налази се 7 страница које нису нумерисане, а односе се на наслов, посвету и садржај докторске дисертације. На крају се налази 5 прилога на 15 страница које нису нумерисане.

**У првој целини** (странице 1-39) је истакнут разлог због кога је спроведено ово истраживање. Описана је савремена терминологија и класификација антигена еритроцита, дате су најважније напомене о клиничком значају антигена система Rh, њихова терминологија, као и молекуларна основа гена Rh. Дат је осврт и на повезаност антигена система Rh са антигенима система RhAg и LW. Посебна пажња посвећена је клиничком значају RhD антигена и антигена Rh фенотипа, као и молекуларној класификацији различитих облика-варијанти RhD антигена. Указано је на класификацију и укупан број до сада утврђених слабих и парцијалних облика овог антигена, као и на карактеристике његових појединачних облика приликом серолошког одређивања. Истакнут је значај тачног утврђивања RhD статуса даваоцима, примаоцима крви и трудницама, за примјену безбедне трансфузије и чување резерви RhD-негативне крви и анти-D имуноглобулина. Посебна пажња посвећена је значају увођења молекуларних тестова за утврђивање различитих варијанти антигена D, као и алгоритму за серолошко и молекуларно доказивање овог антигена, с обзиром да је то тест који се изводи при сваком утврђивању крвне групе свим категоријама испитаника.

**У другој целини** су на јасан и прецизан начин изнијети циљеви (страна 40) истраживања у овој докторској дисертацији, како би се у испитиваној популацији давалаца крви утврдило тачно присуство варијанти слабијих и парцијалних облика RhD антигена, оцијенила стручна и практична ваљаност примјењеног алгоритма за серолошко тестирање овог маркера, као и валидност уведеног метода за молекуларно тестирање крвних група.

**У трећој целини** (страна 41) представљене су хипотезе овог истраживања, које истичу значај увођења правилног алгоритма за серолошко утврђивање RhD антигена, као и неопходност увођења молекуларне типизације RhD антигена ради добијања прецизних резултата испитивања крвне групе. Наведено је очекивање, које се базира на објављеним резултатима научних истраживања, да ће се молекуларном методом у испитиваној популацији давалаца крви утврдити најчешће варијанте антигена D у до сада испитаној бијелој популацији, а то су слаби D типови 1, 2 и 3, који се третирају као RhD-позитивни у случају примјене трансфузије и RhD заштите, што има стратешки значај за управљање резервама крви на националном нивоу.

**Четврта целина** (странице 42-82) обухвата детаљан опис критеријума за избор испитаника међу даваоцима крви, који су чинили узорак за ово испитивање. Поред

тога, дат је детаљно и јасно опис материјала и метода који су кориштени у овом испитивању.

**У петој цјелини** (стране 83-107) систематски су дати резултати испитивања RhD антигена и Rh фенотипа у испитиваној популацији давалаца крви серолошким техникама и методама, као и молекуларном методом, у категорији давалаца крви са слабим D антигеном и у групи RhD-негативних давалаца крви. Прецизно су представљени резултати испитивања анти-D тест реагенса са различитим карактеристикама. Показана је и корелација добијених резултата у односу на пол, крвно групни систем АБО, број давања крви и Rx фенотип.

**Шеста цјелина** (стране 108-122) представљена је дискусијом добијених резултат и њиховим поређењем са већ објављеним резултатима у овој научној области. Представљени су и образложени научни и прагматични доприноси овог рада у имунохематологији и трансфузиологији, као и у клиничкој пракси.

**У седмој цјелини** (стране 123-124) аутор је на јасан и систематичан начин изнијео синтезу сазнања и научних чињеница добијених на основу резултата истраживања и тестирања хипотеза. На бази добијених научних сазнања дате су препоруке за даљи алгоритам тестирања RhD антигена даваоцима и трудницама, као и основе за националну стратегију управљања резервама крви. Поред тога, дат је приједлог основе за развој Националне референтне лабораторије за имунохематологију и имуногенетику.

**Осма цјелина** ((стране 125-139) представља списак кориштене литературе у овој студији.

**У деветој цјелини** (140-155) дати су прилози, које чине табеле са варијантама антигена D, текст сагласности испитаника за учествовање у испитивању, двије табеле са прегледом мутација код одређених варијанти антигена D у односу на тестове кориштене за молекуларну типизацију (Inno Train, Germany). Пети прилог представља табелу у којој су приказани резултати испитивања 55 узорака еритроцита давалаца крви са различитим анти-D тест реагенсима из панела DiaSCREEN (Diagast).

- 1) Наслов докторске дисертације;
- 2) Вријеме и орган који је прихватио тему докторске дисертације
- 3) Садржај докторске дисертације са страничњем;
- 4) Истачи основне податке о докторској дисертацији: обим, број табела, слика, шема, графика, број цитиране литературе и навести поглавља.

#### IV УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

- 1) Послије крвногрупног система АБО, Rh представља најважнији крвногрупни систем за клиничку праксу, због имуногености антигена који му припадају [176-177]. Најважније Rh антигене, RhD, RhC, RhE, Rhc i Rhe, кодирају два сусједна генска локуса, [12], чија непосредна близина на хромозому 1, као и положај *RHD* и *RHCE* гена на *RH* локусу омогућавају измјену генетичког материјала, која заузврат доводи до настанка многих клинички значајних варијанти RhD антигена [35], од којих се неке тешко доказују стандардним серолошким методама (на пример, DEL).

Зато се често, послије извођења стандардних имунохематолошких тестова, особе са овим фенотиповима означавају као RhD-негативне [65]. Пошто је уочено да крв давалаца који имају неку од RhD варијанти која не може да се докаже серолошким техникама може да доведе до стварања анти-D антитијела код RhD-негативних прималаца [55,68,74], свеобухватно испитивање RhD-негативних давалаца суштински је значајно за утврђивање оних јединица крви које могу да изазову имунизацију RhD-негативних пацијената. Ова појава је примјећена и код давалаца који су серолошким методама доказани као RhD-негативни, а у Rh фенотипу имају С и/или Е антиген.

Кандидаткиња је у својој докторској дисертацији аргументовно и објективно представила предмет истраживања- испитивање свих серолошких доказаних слабих облика антигена D, као и RhD-негативних облика, са С и /или Е антигеном у Rh фенотипу, молекуларном методом, у популацији давалаца крви Завода за трансфузијску медицину у Бањој Луци, у периоду од априла 2016. до априла 2017. године. Научни циљ је стицање сазнања о наведеном проблему истраживања, односно постојању варијанти антигена D, њиховим типовима и распрострањености у популацији давалаца крви у Републици Српској, на основу чега би се могло вршити планирање резерви крви и алгоритма тестирања давалаца крви, а на бази релевантне грађе за потребе здравственог система.

- а) Утврдити молекуларним методама да ли даваоци крви у популацији Републике Српске, код којих је серолошки одређен слаби облик антигена D, заиста имају слабо изражен антиген D, парцијални антиген D или комбинацију ова два типа;
- б) Код доказаних слабих и парцијалних облика антигена D, утврдити њихову учесталост и упоредити је са учесталошћу слабих и парцијалних антигена D у другим популацијама бијеле расе;
- в) Утврдити да ли код особа са слабим или парцијалним обликом антигена D постоје оне које су створиле анти-D антитијело и да ли су ти подаци у складу са онима објављеним у литератури;
- г) Тестовима молекуларне дијагностике доказати да ли даваоци крви, серолошки утврђени као RhD-негативни, RhD фенотипа Ccddee и cdddEe, имају ген RHD и антиген D на еритроцитној мембрани, толико слаб да се не може доказати серолошким техникама, нити доступним анти-D тест серумима;
- д) Ретроспективном студијом утврдити да ли је неки од RhD-негативних прималаца, Rh фенотипа ccddee, који су примали крв фенотипа Ccddee и cdddEe створио анти-D антитијело послије примјене крви са назначеним фенотиповима;
- ђ) На основу добијених резултата, направити регистар особа са варијантама антигена D, како би у сваком тренутку располагали са адекватним подацима о даваоцима крви у Републици Српској, на основу чега би се могла вршити размјена података са међународним Регистрима ријетких крвних група;
- е) Постављање базе за Националну референтну лабораторију за имунохематологију

и молекуларну имунохематологију у Заводу за трансфузијску медицину Републике Српске.

2) Преглед релевантне литературе даје увид у актуелност и значај теме ове докторске дисертације, као и у резултате претходних истраживања из ове области у свијету, док се у нашој земљи ова истраживања до сада нису спроводила. Мало је објављених резултата који се односе на истраживања овог типа у региону.

Стратон је први повезао термин D<sup>w</sup> са антигеном RhD који може да се докаже само неким анти-D тест серумима. Термин D weak (слаби D) традиционално је подразумијевао комплетан антиген D, који има све епитопе, али слабо изражене. Више година се сматрало да раздавање фенотипа weak D од парцијалног D има значаја за клиничку праксу, зато што особе са фенотипом D weak неће створити анти-D антитијло послије примјене D-позитивне крви, јер је њихов антиген D, иако слабији, нормалне грађе.

За разлику од њих, сматрало се да особе са парцијалним D могу да створе анти-D антитијело послије примјене D-позитивне крви против дијела антигена D који им недостаје, па зато могу да приме само D-негативну крв [1-3].

Међутим, значај ове претпоставке умањен је послије запажања да полипептид D код особа са фенотипом D weak није нормалне грађе, као и да особе са овим фенотипом могу да створе анти-D антитијело. Многи примјери weak D и парцијалног D испитани су на молекуларном нивоу [4-9].

У почетку су молекуларне анализе D weak указивале да нема промјена у секвенцима преписаног гена RHD, нити у промоторном региону гена. Wagner и сар. 1999. године развили су методу за секвенционирање свих 10 екsonа гена *RHD* [9-13]. Резултат испитивања 161 узорка серолошки класификованих као D weak показао је да ниједан од њих није имао нормалне секвенце екsonа D. Замјене аминокиселина у анализираним случајевима углавном су биле локализоване на трансмембрanskом и у цитоплазматском дијелу петље протеина, док ниједна није била локализована у његовом екстрацелуларном дијелу. Доказано је да мутације утичу на уградњу протеина у мембрну, па долази до смањеног броја антигена на еритроциту [1-3]. Тако се дошло до закључка да је у клиничкој пракси веома значајно одвојити слаби (weak) D од парцијалног антигена D, зато што пациенти са weak D фенотипом неће створити анти-D антитијело послије примјене D-позитивне крви (јер је њихов антиген ослабљен, али нормалан). За разлику од њих, пациенти са парцијалним антигеном D могу да се имунизују на дио антигена D који им недостаје, па би зато требало да примају трансфузије D-негативне крви.

Откривање анти-D антитијела код особе са слабим D тип 15 показало је да ова подјела није доволно ни јасна нити прецизна, уколико је дефиниција да само особе са парцијалним D стварају анти-D антитијело тачна. Суштински, фенотип слаби D тип 4.2 функционално је идентичан парцијалном антигену DAR, а описано је да еритроцити ова два фенотипа доводе до стварања анти-D антитијела код примаоца [2]. Еритроцити фенотипа D weak тип 2 имају најмању густину антигена од свих

најчешћих типова weak D антигена. Због тога су Флегел и сар. препоручили да еритроцити фенотипа D weak тип 2 представљају праг за детекцију анти-D тест реагенаса и да се користе као дио контроле квалитета у рутинском имунохематолошком раду [10].

Тако је валидност становишта да особе са D weak фенотипом не могу да створе анти-D антитијело, као и да не могу да изазову имуни одговор код D-негативних прималаца доведена у сумњу [2-3]. Флегел је својим истраживањем показао да постоје различите субституције нуклеотида у гену *RHD* које доводе до замјене аминокиселина у узорцима еритроцита са фенотипом D weak, што је указало на њихову ненормалну структуру, као и да особе са овим фенотипом могу да створе анти-D антитијело [4-9].

У пракси се често користе 2 дефиниције за парцијални и слаби облик D антигена, од којих ниједна није у потпуности задовољавајућа: 1) " Особе које имају парцијални облик антигена D могу да створе анти-D антитијело, док они са слабим обликом антигена D не могу". Недостатак ове дефиниције је у томе што особе са варијантом антигена D могу да буду проглашене osobama са слабим обликом антигена D, јер не постоје објављени подаци да је испитаник са дотичним обликом антигена D икада створио анти-D антитијело. То, међутим, не значи да особа са таквим D фенотипом неће створити анти-D антитијело послије примјене трансфузије D позитивне крви или трудноће са D позитивним фетусом". 2) " Код особа са парцијалним антигеном D, RhD протеин има промјене аминокиселина у односу на нормални RhD у оквиру једне или више спољашњих петљи RhD полипептида, за разлику од RhD протеина код особа са слабим D, који имају једну или више замјена аминокиселина у оквиру трансмембрanskог или цитоплазматског дијела протеина, али се та промјена не експримира изван мембрање еритроцита". Основни проблем са овом дефиницијом је што су прецизни локалитети резидуа аминокиселина Rh протеина у оквиру мембрање еритроцита непознати. Поред тога, ова дефиниција није функционална ни са аспекта трансфузиолошке праксе, јер се одређивање *RHD* генотипа још увијек не ради рутински у многим банкама крви, чак ни у референтним лабораторијама [2].

Такозвани парцијални RhD фенотипови добили су ознаке као што су DIIa, DVI, DBT и DFR. Они се међусобно могу раздвојити како серолошким, тако и молекуларним методама, а најмање једна особа са било којим од ових фенотипова створила је анти-D антитијело. Облици слабијег D фенотипа обиљежени су бројевима од слаби D тип 1 до слаби D тип 81, а постоји још неколико интермедијарних облика (на пример, слаби D-4.2), чији број наставља да расте. Ови слабији облици антигена D повезани су са мањом експресијом антигена D на еритроцитној мембрани, али их је међусобно могуће разликовати искључиво примјеном молекуларних метода тестирања. Поред тога, неки облици, а посебно фенотипови слабих D-4.2, -15 и -21, утврђени су код пацијената који су створили анти-D антитијело [13-14]. Најчешћи тип слабо израженог антигена D је тип 1, који има мутацију аминокиселина Val270Gly и који заједно са типовима 2 и 3 представља око 90% D weak фенотипова доказаних код особа европског поријекла

[15-16]. Према објављеним подацима, од укупног броја тестираних узорака, учесталост за D weak тип 1 је 70%, за D weak тип 2 износи 18%, док је за D weak тип 3 фреквенција 5%. D weak тип 1 карактеристичан је за хаплотип DCe, D weak тип 2 за хаплотип DcE, D weak тип 3 за хаплотип DcE. Најчешћи је тип 1, који има мутацију аминокиселина Val270Gly и који заједно са типовима 2 и 3 представља око 90% D weak фенотипова доказаних код особа европског поријекла [13-14]. Ови налази довели су у сумњу практични значај важећих ставова о подијели варијанти D на D weak и парцијални D. За разлику од неких облика парцијалног D, није описана ниједна алоимунизација код особа које имају слабе облике антigena D тип 1, 2 или 3 [17], али прије десетак година објављен је податак да је јединица крви са фенотипом D weak тип 1 довела до стварања анти-D антитијела код D-негативне особе, која никада прије тога није добијала крв [16]. Са клиничке тачке гледишта ово је значајно, јер укључује најчешће D алеле, које представљају 90% свих слабих D типова у Њемачкој и Европи. Пацијенти слабих D фенотипова 1, 2 и 3 могу да добију D позитивну крв и не захтијевају примјену D негативних продуката. Ова процедура омогућава чување око 5% свих D негативних компоненти еритроцита.

База у којој су похрањени подаци са познатом молекуларном основом већине уобичајених варијанти D у различitim популацијама попуњава се убрзано. Неки аутори сматрају да би требало осмислити план молекуларних тестирања за откривање имуногених варијанти антigena D, које су у испитиваној популацији добровољних давалаца крви релативно честе, сматрајући то поузданijим путем ка сигурној трансфузији и важном допуном актуелних препорука за имунохематолошка тестирања антigena D даваоцима, пациентима и трудницама него што је подјела на D weak и парцијални D [17-18].

Свакој јединици крви узетој од добровољних давалаца крви, неопходно је одредити RhD антigen. Код првог давања Стандарди препоручују обавезно кориштење двије технике од којих једна мора да буде аутоматизована. Под техникама подразумијевају се микротитарска плоча, епрувета и гел картица, а под реагенсима моноклонски и поликлонски тест серуми. Реагенси у другој техници требало би да буду од другог производа или друге серије истог производа. Код осталих давања, дозвољава се тестирање једном техником. У случају изостанка позитивног налаза у иницијалном тестирању, Стандарди земаља централне Европе и већине земаља које су припадале бившој Југославији предвиђају да се испитивање варијанти антigena D настави техником индиректног антителобулинског теста. Прије неколико година у више лабораторија централне Европе рађене су студије које су имале за циљ утврђивање учесталости алела RHD молекуларним методама, код особа које су серолошки биле D-негативне, са антigenом C или E у Rh фенотипу. Ове студије такође су анализирале ризик од имунизације D-негативних прималаца послије трансфузије еритроцита фенотипа D weak. Тако се дошло до закључка да се пропуст у утврђивању антigena D моноклонским ант-D реагенсима најчешће догађа код серолошки D-негативних давалаца, који у Rh фенотипу имају антigenе C или E. Зато би у рутинском тестирању приликом првог давања крви, испитивање требало допунити индиректним антителобулинским тестом, јер овај тест открива већину D варијанти (фенотипова D weak и парцијални D). Послије детаљне анализе

начина одређивања антигена D даваоцима крви у више Лабораторија у централној Европи и другим регијама, Међународни форум за доказивање слабије израженог антигена D препоручио је рутинску примјену индиректног антиглобулинског теста код свих D-негативних давалаца, а посебно оних који у фенотипу имају антиген С или E. Учесталост давалаца крви којима је антиген D доказан само у индиректном антиглобулинском тесту, према подацима овог форума, креће се од 0, 01% у Шпанији до 4, 1% у Данској [17, 19-21].

Ова истраживања показала су да око 1% становника централне Европе има RHD алеле са аберантном структуром које кодирају настанак антигена D са смањеном реактивношћу. Из тих разлога у Њемачкој се већ неколико година свим даваоцима крви (који су серолошким методама одређени као D-негативни) утврђује RH генотип, како би се међу њима доказали носиоци аберантних RH алела, а посебно фенотип DEL и D+- химере и тако спријечила могућност сензибилизације D-негативних прималаца, посебно дјевојчица и жена у генеративном периоду. Већина чланова интернационалног форума ипак је била становишта да рутинско тестирање *RHD* статуса не треба да буде обавезно [19-23]. Како је RHD\*DEL обично повезан са генима *RHCE\*Ce* или *RHCE\*cE*, неколико учесника форума заступало је став да се D примаоцима, посебно дјевојчицама и женама у генеративном добу трансфундује крв Rh фенотипа ccddee. Студијом спроведеном у Данској, током које је тестирано 5058 серолошки D-негативних давалаца на присуство *RHD* гена, молекуларном дијагностиком утвђено је 13 особа са овим геном. Сви даваоци који су имали ген *RHD*, били су фенотипа DEL [24]. Ретроспективном анализом утврђено је да је 13 давалаца који су имали *RHD* ген дало 136 трансфузија D-пацијентима, а само један прималац створио је анти-D антитијело. Закључак ове студије је да би било тешко оправдати трошкове тестирања свих серолошки D-давалаца на присуство RHD гена.

За одређивање RhD антигена даваоцима крви, најважније је да еритроцити који могу да имунизују D негативног пацијента да створи анти-D антитијело, буду означени као RhD+(поз). Сходно томе, тест серуми за одређивање D антигена даваоцима крви бирају се према способности да дају позитивну реакцију са еритроцитима који су фенотипа DVI и других варијанти антигена D, које доказано могу да створе имуни одговор код D-негативних особа. Оно што одступа од овог правила је утврђивање варијанте DEL, која се не може доказати тестовима аглутинације, чак ни послије примјене антиглобулинског теста.

Из свега наведеног произилази да свака трансфузиолошка служба на националном нивоу треба да утврди учесталост најчешћих варијанти антигена D у својој популацији давалаца крви, као и да најrizичнијим категоријама давалаца који имају Rh фенотипове Ccddee и ccddEe молекуларном дијагностиком утврди евентуално постојање *RHD* гена, како не би дошло до сензибилизације D-негативног примаоца.

Трудницама са слабим облицима D антигена типова 1 до 3, које су и даваоци крви, не мора да се да D-негативна крв за трансфузију, а ни RhD имунопрофилакса није обавезна. Према подацима из литературе, само у Њемачкој сваке године,

једнократно генетско испитивање присуства RHD гена код трудница штеди примјену понављање RhD имунопрофилаксе за 3500 трудница, што је око од 5% свих негативних трудноћа у тој земљи. То значи да је око 5% од свих анти-D ињекција непотребно [17]. На тај начин се штеди анти-D имуноглобулин, чији су ресурси, као што је познато, ограничени.

Филогенетска испитивања алела *RHD* доприњела су опису четири кластера: европски D кластер са консензус алелом *RHD* (Genbank mRNA NM016124.3), најчешћим алелом код људи, као и три афричка кластера, обиљежена као DIVa, DAU и слаби(weak) D тип 4. Кластери се дефинишу као групе алела који се разликују од консензус алела *RHD* и обухватају многе алеле код којих су настале додатне замјене аминокиселина [33]. Када се у потпуности открију генетске карактеристике алела *RHCE* (Genbank mRNA NM 020485.3) и када добијемо више информација о њиховој повезаности са специфичним *RHD* алелима у хаплотиповима, постојеће филогенетско стабло биће потпуније и боље дефинисано [34].

Током претходне деценије добијене су генетске информације о локусу *RH*, а стечена су и сазнања о значајним варијацијама овог гена. Све је то помогло да се објасне појаве неусаглашених резултата приликом одређивања RhD антигена, као и неке нејасне серолошке обсертације. Надаље, серолошко одређивање RhD антигена увијек је представљало изазов због варијације у производњи анти-D тест реагенаса током година. Иако су моноклонски тест реагенси сензитивнији, познато је да сви анти-D тест серуми не могу да докажу одређене облике парцијалног и слабог RhD антигена [35]. Особе које имају неку од варијанти антигена D која се разликује у односу на нормално изражен D антиген, могу да имају проблем, јер анти-D реагенси добијени из различитих извора показују рзличите јачине аглутинације са испитиваним еритроцитима. Употреба резличитих анти-D тест реагенаса може да доведе до неусаглашености у поступку утврђивања неке од варијанти D антигена.

Одређивање *RHD* генотипа даваоцима крви има већи значај него за примаоце трансфузија, зато што може да искључи особе са слабим D антигеном или фенотипом DEL, у групи наизглед D-негативних давалаца крви [34]. Као даваоци крви, еритроцити особа са слабим и парцијалним облицима антигена D могу да стимулишу стварање анти-D антитијела код D-негативних прималаца. Постало је очигледно да су одређивање генотипа и фенотипа даваоцу много снажније квалитативно оруђе од два или више серолошкa тестa. Без утврђених алгоритама за доказивање фенотипа и генотипа даваоцима крви, RhD-негативни пациенти који су у ризику да приме крв фенотипа слаби D или Del су у сталном ризику да буду имунизовани [36-40]. Други потенцијално озбиљан ризик потиче од серолошких RhD-негативних давалаца крви, који су, у ствари, D-позитивне/D-негативне химере. Ове особе имају мали број D-позитивних еритроцита са нормалном експресијом RhD антигена, тако да једна јединица ових давалаца садржи 10 ml "нормалних" D-позитивних еритроцита [36]. Њиховом трансфузијом може да се подстакне имуни одговор код RhD-негативног примаоца, иако се RhD-позитивни еритроцити не могу доказати рутинским

серолошким техникама [41].

Слаби D антиген доказан серолошким техникама или серолошки слаб D фенотип, дефинише се као облик који са анти-D реагенсом у директној аглутинацији не даје реакцију или даје слабо позитивну реакцију јачине  $\leq 2+$ , док је реакција са антитуман глобулин реагенсом умјерена или јака. Појава неусаглашених резултата код серолошког утврђивања парцијалних или слабих облика антигена D је честа у рутинској пракси, а може да се превазиђе одређивањем RHD генотипа, чиме се обезјбеђује прецизнија анализа [41].

PCR SSP је варијанта PCR методе која може разликовати поједине полиморфизме, који се међусобно разликују само у једној бази (SNPs- *single nucleotide polymorphisms*), будући да су само секвенце прајмера одговорни алели који се тестом одређују [42]. Код Fluogene методе, као и код стандардне PCR-SSP методе кориштене у овом истраживању, паралелно се изводи више multiplex PCR реакција.

Литература цитирана у IV-2

1. Klein HG, Anstee DJ, The Rh blood group system (including LW and RHAG) In: Klein HG, Anstee DJ. Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine. 12th ed. Blackwell Publishing, 2014; p.167–213.
2. Daniels G. Rh and RHAG blood group systems. In: Daniels G. Human Blood Groups. 3rd ed. Wiley-Blackwell Science, 2013; p.182– 259.
3. Westhoff CM. Review: The Rh blood group D antigen. Dominant, diverse, and difficult. Immunohematology 2005; 21: 155–63.
4. Lomas C, McColl K, Tippett P. Further complexities of the Rh antigen D disclosed by testing category DII cells with monoclonal anti-D. Transfus Med. 1993; 3: 67.
5. Gorick B, Dougall DCJ, Ouwehand WH et al. Quantification of D sites on selected "weak D and "partial" D red cells. Vox Sang 1993; 65: 136–40.
6. Agre PC, Davies DM, Issitt PD. et al. A proposal to standardize terminology for weak D antigen. Transfusion 1992; 32:86–7.
7. Contreras M, Knoght RC. Controversies in transfusion medicine: testing for Du:Con. Transfusion 1991; 31:270–2.
8. Scott ML, Voak D, Liu W et al. Epitopes on Rh proteins. Vox Sang 2000; 78(Suppl 2):117–20.
9. Arce MA, Thompson ES, Wagner S, et al. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals. Blood 1993; 82: 651–5.
10. Flegel WA, Wagner FF. Molecular Biology of partial D and weak D:Implications for Blood Bank Practice. Clin. Lab. 2002; 48:53–9.
11. The Rhesus web site. <http://www.uni-ulm.de/fwagner/RH/RB>.
12. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. Blood 1999; 93(1): 385–93.
13. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. Blood 2000; 95:2699–708.

14. McGann H, Wenk RE. Alloimmunization to the D antigen by a patient with weak type 21. *Immunohematology* 2010;26:27-29.
15. Flegel WA, Wagner FF. Molecular Biology of partial D and weak D: Implications for Blood Bank Practice. *Clin. Lab.* 2002; 48:53-9.
16. Mota M, Fonseca N, Rodriguez A, Kutner JM, Castillo L. Anti-D alloimmunisation by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sang* 2005;88: 130-35.
17. Flegel WA. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. *Curr Opin Hematol.* 2006;13:476-83. [PubMed]
18. Gassner C, Doescher A, Drnovsek TD, Rozman P, Eicher NI, Legler TJ, Lukin S, Garritsen H, Kleinrath T, Eggaeer B, Ehling R, Kormoczi GF, Kilga-Nogier S, Schoenitzer D, Petershofen EK. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicentric study. *Transfusion* 2005; 45:527-38.
19. Flegel WA, Wagner FF, Muller TH, Gassner C. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *Transfus Med* 1998; 8: 281-302.
20. Wagner FF, Frohmajer A. and Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genetics* (2001) 2:10 Dostupno na: <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/2/10>.
21. Flegel WA. Blood group genotyping in Germany. *Transfusion*. 2007;47(1 Suppl):47S-53S (Abstract).
22. Avent D, Martinez A, Flegel W, Olsson M, Nogues N, Pisacka, M Scott M, Daniels G, de Haas M. The Bloodgen project: Toward mass scale genotyping for humanblood group antigens. *Vox Sang* 2006; 91:(suppl. 3) (Abstract)
23. Engelfriet CP, Reesink HV, eds. International forum. Testing for weak D.*Vox Sang* 2006; 90: 140-53.
24. Gassner C, Rožman P. RHD DNA screening for weak D, DEL and D+ chimeras. *Vox Sang*. 2006; 91: 184: 1350-55. (Letter).
25. Krog GR, Clausen FB, Berkowicz A, et al. Is current serologic RhD typing of blood donors sufficient for avoiding immunization of recipient? *Transfusion* 2011;51:2278-2285.
26. Cowley NM, Saul A, Hyland CA. RHD gene mutations and the weak D phenotype: an Australian blood donor study. *Vox Sang* 2000;79:251-252.
27. Rodrigues MJ, Rodrigues F, Tilley L., et al. Several new examples of weak D type 38 in the Portugese population. *Transfusion* 2006;46(Suppl.):141A-142A[Abstract].
28. St-Louis M, Richard M, Cote M, Ethier C, Long A. Weak D type 2 cases found in individuals of European descent. *Immunohematology* 2011;27:20-24.
29. Dogic V, Bingulac-Popovic J, babic I, et al. Distribution of weak D types in Croatian population. *Transfus Med* 2011;21:278-279.
30. Lacey PA, caskey CR, Werner DJ et al. (1983) Fatal hemolytic disease of a newborn due to anti-D in a Rh-positive D<sup>u</sup> variant mother. *Transfusion* 23:01.
31. Flegel WA, Khull SR, Wagner FF (2000) Primary anti-D immunisation by weak type 2 RBCs. *Transfusion* 40: 428-434.
32. Wagner FF, Gassner C, Muller TH et al.(1998) Three molecular structures cause rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohaematological features.

Blood 01:2157-2168.

33. Wagner FF, Ladewig B, Angert KS, Heymann GA, Eicher NI, Flegel WA. The DAU allele cluster of the RHD gene. *Blood*. 2002 Jul 1;100(1):306–311. [PubMed].
34. Flegel WA, von Zabern I, Doescher A, Wagner FF, Strathmann KP, Geisen C, Palfi M, Pisacka M, Poole J, Polin H, et al. D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian D clusters. *Transfusion*. 2009 Jun;49(6):1059–1069. [PubMed].
35. Carritt B, Blunt T, Avent N, Daniels G, Steers F. Rh null phenotypes are not due to a gross deletion and can occur on different Rh genetic backgrounds. *Ann.Hum.Genet.* 1993 Oct;57(Pt 4):273–279. [PubMed].
36. Denomme GA, Dake LR, Vilensky D, Ramyar L, Judd WJ. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion* 2008;48:473–77.
37. Beck ML, Harding J. Incidence of D category VI among Du donors in the USA. *Transfusion*. 1991;31(S):25.
38. Lacey PA, Caskey CR, Werner DJ, Moulds JJ. Fatal hemolytic disease of a newborn due to anti-D in an Rh-positive Du variant mother. *Transfusion*. 1983;23:91–94. [PubMed]..
39. Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM, editors. Technical Manual. 18th ed. Bethesda (MD): American Association of Blood Banks; 2014.
40. Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. *Transfusion*. 2005;45:1581–1584. [PubMed].
41. Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, Denomme GA., delaney ., Keller M., Johnson ST., KatZ L., Queenan JT., Vassallo RR., Simon CD. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion* 2015; 55(3):680–9.
42. Williams M, Boam S, Maley M, Nightingale MJ, Ash C, Finning K: Assessment and Validation of Fluogene System for Genotyping Patients Referred to RCI Laboratories, *Transfusion Medicine*, 2014, 24, Suppl. 2, 33–75, P101.

### 3) Допринос тезе у ријешавању описаног предмета изучавања

Ова докторска дисертација даје *допринос описаном предмету* изучавања на тај начин што резултати серолошког и молекуларног тестирања давалаца крви добијени током овог истраживања пружају увид у дистрибуцију и типове варијанти слабог RhD антигена, постојање ало, односно ауто анти-D антитијела код доказаних типова, настанак антитијела код прималаца крви узете од давалаца који су били чинили узорак за испитивање, као и прецизност и валидност примјењених метода. Ово је прво истраживање варијанти слабо израженог антигена D у нашој земљи.

### 4) Научни и прагматични допринос дисертације- Научни допринос

огледа се у закључцима добијеним упоређивањем добијених резултата у нашој популацији са већ објављеним резултатима за друге народе бијеле расе, уочавањем сличности или разлика, као и прихватањем, односно одбацивањем примјењеног алгоритма за

серолошко, односно молекуларно тестирање слабог RhD антигена. Ово истраживање је прво испитивање те врсте у нашој земљи. *Прагматични допринос дисертације* огледа се у пружању могућности за сагледавање дистрибуције слабог D антигена у нашој популацији, ради бољег планирања разерви крви, рационалној примјени RhD-негативне крви примаоцима са варијантама слабог D антигена, пружању RhD имунопрофилаксе женама у трудноћи са слабо израженим D антигеном, као и осмишљавању рационалне и савремене стратегије засноване на стручним критеријумима за испитивање RhD антигена прије свега код давалаца крви, али и код трудница. Сви ови подаци дају могућност размјене података и, по потреби, преузимања крви од Служби за трансфузију крви у свијету.

- 1) Укратко истаћи разлог због којих су истраживања предузета и представити проблем, предмет, циљеве и хипотезе;
- 2) На основу прегледа литературе сажето приказати резултате претходних истраживања у вези проблема који је истраживан (водити рачуна да обухвата најновија и најзначајнија сазнања из те области код нас и у свијету);
- 3) Навести допринос тезе у рјешавању изучаваног предмета истраживања;
- 4) Навести очекиване научне и прагматичне доприносе дисертације

## V МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

- 1) Материјал који је обрађиван, критеријуми који су узети у обзор за избор материјала;

Испитаници, материјал и методе који су кориштени у овој дисертацији су у складу са постављеним циљевима и описаны су на четрдесет три стране. Овај детаљан опис испитаника, материјала и метода омогућио је увид у посматрану проблематику и пружио одговор на научни проблем, односно предмет истраживања. За израду ове докторске дисертације кориштени су узорци крви редовних добровољних давалаца, који испуњавају те услове према дефиницији Свјетске здравствене организације. Они су морали да испуне још један критеријум, а то је да су серолошким техникама, методом у епрувети, методом у микроплочи и методом у гелу, одређени као особе са слабије израженим RhD антигеном, на основу јачине аглутинације, односно постављеног алгоритма тестирања, а према упутству произвођача тест реагенаса. У испитивање су укључени и узорци крви давалаца који су RhD-негативни, са C и/или E антигеном у Rh фенотипу. У бази података Завода за трансфузију медицину у Бањој Луци од априла 2016. до априла 2017. године евидентирано је 85 особа са доказаним слабијим обликом антигена D, као и 92 RhD-негативна, C+/E+ даваоца крви. Сљедећи критеријум био је давање сагласности за испитивање, потписивањем обрасца "Образац сагласности са информацијом о пристанку на узимање узорка крви за молекуларно испитивање варијанти антигена D" (Прилог 2.), који је одобрен од стране Етичког одбора Клиничког центра у Бањој Луци.

- 2) Кратак увид у примијењени метод истраживања:

Узимајући у обзор достигнућа на пољу савременог серолошког и молекуларног тестирања крвних група даваоцима крви, а нарочито код одређивања слабог D антигена, као и код потврђивања RhD статуса даваоцима крви који су Rh фенотипова Ccddee, ccddEe, CCddee, CcddEe и др., примијењене методе

истраживања су адекватне, довољно тачне и савремене, имајући у виду достигнућа на том пољу у свјетским нивоима, као и предочени опис метода кориштених у овој студији. Критеријуми за избор испитаника су адекватни, изабрани алгоритам за тестирање у складу је са савременим стручним препорукама. Даваоци крви који су методом у микроплочама на апарату TechnoTwinStation одређени као RhD-негативни, провјеравани су мануелним методом, уз кориштење тест реагенаса анти-D произвођача CE Immunodiagnostika класе IgG и IgM, као и панел моноклонских анти-D тест реагенаса за доказивање слабих и парцијалних облика антигена D (D-SCREEN) класа IgG и IgM, произвођача Diagast. Свим RhD-негативним даваоцима крви и даваоцима крви са варијантама антигена D одређиван је Rh фенотип, методом у микроплочама, на апарату TechnoTwinStation. RhD статус давалаца крви додатно је потврђиван тестом за слаби D, уз помоћ моноклонског анти-D тест реагенса и ID картица-анти-IgG и Liss/Coombs, методом у гелу.

Уколико је јачина реакције у микроплочи била слаба (према упутству производијача за интерпретацију налаза методом у микроплочама) или негативна, у епрувети у директној аглутинацији  $\leq 2+$ , а у индиректном антителобулинском тесту  $\leq 3+$ , методом у епрувети и методом у гелу, резултат је интерпретиран као варијанта антигена D, односно слаби (weak) RhD антиген.

Код осамдесет пет серолошки доказаних RhD антигена, као и 92 RhD-негативна даваоца, C+/E+, рађена је молекуларна типизација, прије свега китом за молекуларни скриинг, а онда китовима D weak и CDE, методом PCR-SSP, уз флуорометријско очитавање на апарату FluoVista, (према описаној процедуре у поглављу Испитаници, материјал и методе), ради потврде налаза добијених серолошким методама. Током израде дисертације није дошло до промјене у односу на план истраживања који је дат приликом пријаве докторске тезе. Испитивани параметри дају довољно елемената, они су тачни и савремени, имајући у виду достигнућа у овој области.

*Статистичка обрада података је адекватна.* Резултати су приказани у табелама и сликама, и описани ријечима у тексту. Статистичка обрада података рађена је у статистичком пакету SPSS 22 за Windows. Примарно добијени подаци анализирани су дескриптивним статистичким методима: мјерама централне тенденције, мјерама варијабилитета и показатељима структуре исказаним у процентима.

Анализирајући обрађени материјал, кориштене методе и испитанике узете у истраживање, а на основу досадашњих искустава и достигнућа у овој области, комисија констатује да су кориштени методи адекватни, а испитивани параметри довољно обрађени и објективно тумачени.

- 
- 1) Објаснити материјал који је обрађиван, критеријуме који су узети у обзир за избор материјала;
  - 2) Дати кратак увид у примјењени метод истраживања при чему је важно оцјенити сљедеће:

1. Да ли су примијењене методе истраживања адекватне, довољно тачне и савремене, имајући у виду достигнућа на том пољу у свјетским нивоима;
  2. Да ли је дошло до промјене у односу на план истраживања који је дат приликом пријаве докторске тезе, ако јесте зашто;
  3. Да ли испитивани параметри дају довољно елемената или је требало испитивати још неке, за поуздано истраживање;
- Да ли је статистичка обрада података адекватна.

## VI РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

### 1) Резултати истраживања

Резултати истраживања ове докторске дисертације приказани су на 29 страна (поглавље

Резултати и Прилог 5) и анализирани су у поглављу Дискусија, кроз 14 страница. Примјеном описаних метода испитивања и кориштењем материјала који је представљен у претходном одјељку, кандидаткиња је испитивањем узорака крви двије групе редовних давалаца крви добила сљедеће резултате:

Учесталост давалаца крви у популацији Републике Српске у односу на укупан број становника старосне доби од 18 до 65 година на основу пописа из 2013. године је 1,1%. Учесталост слабије израженог RhD антигена у односу на укупан број давалаца крви износио је 0,99% или 1,0%, док је у односу на укупан број RhD-позитивних давалаца, којима су обухваћени и даваоци са серолошки слабије израженим RhD антигеном износила 1,2%.

У групи од 85 давалаца крви, којима је серолошки доказан RhD антиген, према алгоритму описаном у претходном одјељку, 37,6% је женског 62,4% је мушких пола. Крвна група А заступљена је код 45,9%, В код 16,5%, AB код 5,9% и О код 31,8%. Серолошки доказан и молекуларно потврђен Rh фенотип је дистрибуиран на сљедећи начин: а) CcDwee је доказан код 92,9% од укупног броја испитаних давалаца крви из ове групе, CCDwee код 2,4%, ccDwEe код 3,5% и CCDNB ee код 1,2% (давалац чији је тип парцијални облик D антигена назван DNB). Слаби D тип 1 је одређен код 35,3% из ове групе, тип 3 код 58,8%, тип DNB код 1,2% и код 4,7% давалаца су остали облици, који се нису могли прецизно дефинисати постојећим методом. Медијана броја давања крви износила је 2 пута. Од 55 узорака крви давалаца из ове групе испитних панелом од 9 анти-D тест реагенаса класа IgM и IgG, највећи број је показао јачину аглутинације од 3+ у реакцији са моноклонским анти-D тест реагенсima 2IgG (њих 44), 4IgG (њих 44), 7IgG (њих 43), 8IgG (њих 44) i 9IgG (укупно 44). Негативан налаз, односно изостанак аглутинације, показао је највећи број испитиваних узорака (47 и 49), у реакцији са моноклонским анти-D тест реагенсima класе IgM, 5IgM и 6IgM. RhD антиген тип 3 доказан је са највећом учесталошћу у испитиваној популацији давалаца крви мушких и женских пола (30 давалаца мушких и 20 тестиралих давалаца женског пола у односу на укупан број од 85 испитаних), за њим сlijedi тип 1, који је доказан код 21 особе мушких и 9 особа женског пола, а код једне особе женског пола доказан је

парцијални облик D антигена-DNB. У по два случаја и код давалаца мушких и код давалаца женског пола утврђени су остали облици варијанти D антигена. Највећа учсталост слабог D антигена типова 1 и 3 запажена је код особа крвне групе А (15 и 22, од укупног броја тестираних давалаца крви), која је и најзаступљенија у испитивању групи давалаца крви, а онда код испитаника крвне групе О (6 и 19 од укупног броја испитиваних давалаца крви). Највећи број слабог D антигена типова 1 и 3 доказан је код особа Rh фенотипа CcDwee (29/97% i 49/98%, од укупно 79 испитаних давалаца крви са Rh фенотипом CcDwee, који је и најчешће заступљен у испитиваном узорку, што чини 93% у односу на укупан број испитаних особа); типови 1 и 3 доказани су код по једног испитаника фенотипа CCDwee, као и парцијални облик DNB, што је укупно 3 испитаника, односно 3,6% у односу на укупан број од 85, односно 100% тестираних; а остали облици варијанти антигена D доказани су код 1 даваоца крви Rh фенотипа CcDwee и 3 даваоца Rh фенотипа ccDwEe.

У овом истраживању су учествовала и 92 RhD-негативна даваоца крви. Од тога је било 16,3% женског и 83,7% мушких пола. Крвна група типа А је заступљена код 37,0%, типа В код 20,7%, типа AB код 7,6% и типа О код 34,8%. Медијана броја давања крви у овој групи износила је 5 пута. Rh фенотип код ове групе давалаца крви је дистрибуиран на сљедећи начин: CcDwee је доказан код 7,6%, ccddEe код 23,9%, Ccddee код 60,9%, CcddEe код 3,3%, CCddee код 2,2%, а код 2,2% давалаца је остао непотврђен. Позитиван налаз молекуларног скрининга утврђен је код 9,8%, а негативан код 90,2% давалаца крви. Од деветоро испитаника, чији је молекуларни скрининг био позитиван, слаби D тип 1 одређен је код 22,2% давалаца, тип 11 код 44,4%, тип 3 код 11,1% и код 22,2% давалаца је остао неодређен. Дистрибуција молекуларно одређених варијанти RhD антигена, према Rh фенотипу, код серолошких RhD-негативних давалаца крви је: тип 11, код четири давалаца крви, тип 1 код два даваоца крви и тип 3 код једног даваоца крви. Највећу учсталост међу испитаницима имала је крвна група А, сlijеди је крвна група О, потом крвна група В и онда крвна група AB. Варијанте антигена D утврђене молекуларном техником код серолошких RhD-негативних давалаца крви са највећом учсталошћу су доказане код особа крвне групе О. У свим тестирањима, код сваког давања крви, скрининг на присуство антиеритроцитних антитијела показивао је негативан налаз.

2) Резултати добијени у овом истраживању приказани су на јасан и прегледан начин. Они су објективно тумачени и кандидаткиња је показала стручан и критичан став у односу на процејну резултата. Дискусија резултата показује да је кандидаткиња способна да прикупи, обради и презентује резултате на прегледан начин, као и да јасно, систематично и свеобухватно анализира и разматра добијене резултате, упоређујући их са подацима из литературе.

### 3) Нова сазнања проистекла из овог истраживања

Ово истраживање је прво молекуларно испитивање еритроцитних гена и антигена у популацији Републике Српске. Резултати о постојању и учсталости добијених типова слабих облика RhD антигена представљају научни допринос изучавању дистрибуције слабих варијанти антигена D код људи бијеле расе. Посебно су

значајна сазнања о постојању изузетно слабих облика RhD антигена код особа које су серолошким техникама већ одређене као D-негативне и у нашој популацији.

#### *Теоријски допринос сазнања проистеклих из овог истраживања*

Теоријски допринос сазнања проистеклих из овог истраживања огледа се у утврђивању најчешћих типова слабог D антигена у нашој популацији, који се унеколико разликује од резултата добијених у неким другим популацијама бијеле расе, где је најчешћи тип 1, док је код нас предоминантан тип 3 слабог D антигена; парцијални облик антигена D, DNB, доказан је код фенотипа CCDN<sub>B</sub>e, што је рјеђе у односу на Rh фенотип који се обично доказује уз овај, иначе риједак облик парцијалног D антигена, а то је CcDN<sub>B</sub>e, а молекуларно испитивање показало је присуство ријетког слабог D типа 11 код серолошки D-негативних давалаца крви. Оно што је описано у литератури, доказало се и у нашем истраживању- да се нестандартним техникама адсорпције и елузије могу утврдити и ови облици, уз постојање едукованог стручног кадра и одговарајуће опреме.

*Практични допринос сазнања проистеклих из овог истраживања* огледа се у повезивању научних доказа и чињеница са резултатима добијеним у овом истраживању. То практично значи да планирање резерви крви може да се врши на основу резултата молекуларног испитивања варијанти антигена D у популацији давалаца крви, јер научна сазнања говоре који типови варијанти овог антигена треба да добијају D-негативну, а који D-позитивну крв, а исто се односи и на RhD имунопрофилаксу. Практичан допринос овог истраживања огледа се и у потврди валидности алгоритма за серолошко испитивање слабог D антигена, јер су сви доказани слаби облици овог антигена серолошким путем потврђени и молекуларном типизацијом.

#### *Нови истраживачки задаци који се могу назирати из овог истраживања*

Нови истраживачки задаци се виде у увођењу молекуларног тестирања свим RhD-негативним даваоцима крви и трудницама, како би се откриле особе са изузетно слабим облицима D антигена који не могу серолошким путем да се докажу и тако могу да сензибилишу примаоце, а као пациенти треба да добијају RhD-негативну крв или имунопрофилаксу, уколико су труднице; увођење молекуларног скрининга RhD-позитивних давалаца и трудница, како би се утврдили они облици варијанти антигена D који се серолошким методама доказују као RhD-позитивни, а могу да створе анти-D антитијело послије трансфузије или трудноће; проширивањем палете молекуларног тестирања увођењем испитивања RHD зиготности, као и пренаталне неинвазивне молекуларне дијагностике RHD статуса плода код мајке која има анти-D антитијело.

- 1) Укратко навести резултате до којих је кандидат дошао;
- 2) Оцијенити да ли су добијени резултати јасно приказани, правилно, логично и јасно тумачени, упоређујући са резултатима других аутора и да ли је кандидат при томе испољавао довољно критичности;
- 3) Посебно је важно истаћи до којих нових сазнања се дошло у истраживању, који је њихов теоријски и практични допринос, као и који нови истраживачки задаци се на основу њих могу утврдити или назирати.

## VII ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

- 1) Докторска дисертација кандидаткиње мр сц. мед. Гордане Гузијан под називом

"Молекуларна дијагностика слабијих варијанти антигена D у популацији давалаца крви Републике Српске" израђена је у складу са образложењем које је кандидаткиња дала приликом пријаве теме докторске дисертације. Ова докторска дисертација урађена је прма правилима и принципима научноистраживачког рада и резултат је оригиналног научног рада кандидата. Добијени резултати јасно су указали да код свих од 85 испитаних давалаца крви, којима је серолошким методима доказан слаби облик RhD антигена (weak RhD), молекуларним методама је потврђен неки од његових типова, а код једног даваоца утврђен је риједак парцијални облик RhD антигена. У овом испитиваном узорку давалаца крви, од свих слабих облика антигена RhD, најчешћи је слаби облик тип 3 (weak D тип 3), кога слиједи слаби облик тип 1 (weak D тип 1), а у једном случају доказан је риједак тип DNB, што је у корелацији са резултатима добијеним у Хрватској, као и већином других народа бијеле расе. Ни код једног даваоца крви са доказаним слабим обликом антигена D, није доказано анти-D антитијело у серуму, ни природно, нити имуно, зато што доказане варијанте слабог D антигена типова 3 и 1 не стварају ни ало, нити ауто анти-D антитијела. Код 9 (9,8%) од укупно 92 испитана, RhD-негативна даваоца крви, Rh фенотипова Ccddee, ccddEe, CCddee, молекуларним тестирањем утврђено је постојање гена *RHD* и неког од типова слабих варијанти антигена D, што говори у прилог неопходности увођења рутинског молекуларног испитивања присуства гена *RHD* код давалаца крви којима серолошким методама није утврђен RhD антиген, чиме би се спријечила примјена D-позитивне крви RhD-негативним примаоцима, као и њихова имунизација RhD антигеном. Ниједан од RhD-негативних прималаца није створио анти-D антитијело послије примјене трансфузије RhD-негативне крви, Rh фенотипова Ccddee и ccddEe, јер се крв са овим фенотиповима примјењивала искључиво RhD-позитивним примаоцима. Резултати спроведених испитивања показали су да је алгоритам за серолошко и молекуларно доказивање RhD антигена који се примјењује у нашем Заводу за трансфузијску медицину поуздан, захваљујући примјени савремених стручних препорука, квалитетних реагенаса и аутоматизоване опреме. Увођење метода за молекуларну дијагностику слабих типова варијанти антигена D представља основ за развој Националне лабораторије за имунохематологију и имуногенетику, где ће се развијати нестандартне технике за испитивање антигена и антитијела, из домена серолошке и молекуларне имунохематологије. Подаци о дистрибуцији варијанти антигена D имају стратешки значај, јер се као примаоци крви, особе са слабим облицима RhD антигена типа 3 и 1, сматрају RhD позитивнима и могу да добију RhD-позитивну крв, чиме се чувају резерве RhD-негативне крви, а труднице са овим RhD варијантама не треба да добијају RhD имунопрофилаксу. Пацијенти и труднице са неким другим типовима варијанти антигена D третирају се као

RhD-негативни. Молекуарно тестирање RhD варијанти увело би рационализацију трошкова који се издвајају за серолошко испитивање крвних група давалаца крви и трудница.

Кандидаткиња је на основу резултата добијених у истраживању понудила оригиналне податке о дистрибуцији варијанти антигена D, рационалну могућност даљег тестирања популације, као и стручан, објективан и примјенљив приступ у управљању резервама крви. Поред тога, кандидаткиња је прецизно и логички анализирала постављену тему истраживања и довела податке у везу са постављеним хипотезама. Кроз јасно и концизно изношење података учинила је ову, многима непознату тему у нашој стручној јавности, интересантнијом и јаснијом за истраживаче и практичаре, посебно онима из домена гинеколошке и педијатријске праксе. Дисертација представља оригинални допринос изучавањима у трансфузионај медицини, јер даје нове, до сада непознате податке о дистрибуцији варијанти антигена D код особа са серолошки доказаним слабим RhD антигеном и оних који су RhD-негативни.

Чланови Комисије, на основу укупне и свеобухватне анализе докторске дисертације дају позитивну оцјену о завршеној докторској дисертацији под називом "Молекуларна дијагностика слабијих варијанти антигена D у популацији давалаца крви Републике Српске", прим. mr sc. med. dr Гордане Гузијан и предлажу члановима Наставно-научног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци и Сенату Универзитета у Бањој Луци да прихвате овај извјештај и омогуће кандидату да ову докторску дисертацију јавно брани.

#### ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Датум: септембар 2017.

1. Проф. др сц. мед. Милан Скробић  
предсједник

2. Проф. др сц. мед. Драгомир  
Марисављевић, ментор и члан,

3. Проф. др сц. мед. Предраг Грубор, члан,

4. Доц. др сц. мед. Љана Нежин, члан

5. Доц. др сц. мед. Славко Манојловић,  
члан

Doc. dr sci. Prim. dr med.  
Славко Манојловић  
спец.ортопедија са артраматологијом

ИЗДВОЕНО МИШЉЕЊЕ: Члан комисије који не жели да потпише извјештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извјештај образложење, односно разлог због којих не жели да потпише извјештај.