

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ФАКУЛТЕТ:



ИЗВЈЕШТАЈ

о оцјени подобности теме и кандидата за израду докторске тезе

ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

Одлуком Наставно-научног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци број: 18/3.115/2016. од 10.02.2016. године, са III редовне сједнице одржане 09.02.2016. године именована је Комисија за оцјену подобности теме: „Молекуларна дијагностика варијанти слабијег облика антигена D у популацији давалаца крви Републике Српске“ и кандидата мр сц. др мед. Гордане Гузијан, у саставу:

1. Др Милан Скробић, ванредни професор, ужа научна област Нуклеарна медицина, Медицински факултет Универзитета у Бања Луци, предсједник
2. Др Драгомир Марисављевић, редовни професор, ужа научна област Интерна медицина, Медицински факултет Универзитета у Београду, члан
3. Др Предраг Грубор, редовни професор, ужа научна област Хирургија, Медицински факултет Универзитета у Бања Луци, члан

Састав Комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звање, назив уже научне области за коју је изабран у звање, назив универзитета и факултета у којем је члан комисије стално запослен.

1. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ, НАУЧНА И СТРУЧНА ДЈЕЛАТНОСТ КАНДИДАТА

Гордана Гузијан, доктор медицине и магистар медицинских наука, је рођена 18.02.1961. године у Бањој Луци, Република Српска, Босна и Херцеговина. Основну школу и Гимназију је завршила у Бањој Луци. Медицински факултет је завршила 1988. године са просјечном оцјеном осам (8,00). Послиједипломске студије „Биомедицинска истраживања“ је завршила са просјечном оцјеном девет четрдесет пет (9,45), те у новембру 2014. године одбранила магистарски рад, под називом: „Дистрибуција клинички значајних еритроцитних антигена у популацији давалаца крви Републике Српске“.

Радни однос је засновала у ДЗ Лакташи 1989.год. гдје је радила до 1991.год. као љекар опште праксе. Након тога је радила у ДЗ Челинац од 1991. до 1994.год. као

лекар опште праксе. У Клинички Центар Бања Лука је примљена на специјализацију из трансфузиологије 1994.год. у Завод за трансфузију крви. Специјалистички испит је положила 1997.год. на Институту за трансфузију крви Србије – Београд и стекла звање специјалиста трансфузиологије.

На радно мјесто начелника Завода за трансфузију крви КЦ Бања Лука је распоређена 15.05.2000.год. све до 31.08.2008.год.

Од 01.09.2008.год. је обављала дужност в.д.директора ЈУ Завода за трансфузијску медицину РС, а од 30.01.2009.год. одлуком Владе Републике Српске је именована за директора ЈЗУ Завода за трансфузијску медицину Републике Српске.

Као члан радних група Министарства здравља и социјалне заштите РС, учествовала је у изради „Закона о трансфузијској медицини“, „Стратегије сигурне крви у РС до 2015.“ и изради подзаконских докумената. Била је задужена за реорганизацију трансфузиолошке службе у РС, за одвајање у национално координисану службу, као и за оснивање Завода за трансфузијску медицину РС као самосталне здравствене установе. Као директор Завода настојала је да у новооснованој установи стандардизује стручни рад у области трансфузијске медицине, да се унаприједи квалитет рада, да се уведу нове процедуре и обезбиједи довољне количине сигурне крви за лијечење пацијената у Републици Српској. Министарство здравља и социјалне заштите Републике Српске јој је додијелило назив примаријус 2009.год. Као дугогодишњи предсједник Секције трансфузиолога дала је свој добринос у стручном усавршавању колега, организовала је бројне стручне састанке у РС, носилац је бројних радова на конгресима у земљи и иностранству. Повељу Коморе доктора медицине РС за организацију здравствене службе добила је 2010.год.

Библиографија

Магистарска теза

“ Дистрибуција клинички значајних еритроцитних антигена у популацији давалаца крви Републике Српске“ 2014.год.

НАУЧНИ РАДОВИ

1. **Г.Гузијан, С.Гегић, С.Митровић;** Организација Завода за трансфузијску медицину Републике Српске; 23rd Regional Congres of the Ineternational Society of Blood Transfusion Amsterdam, The Netherlands 2013. Vox Sanguinis
2. **Г.Гузијан;** Реорганизација Завода за трансфузијску медицину Републике Српске; 5.Конгрес трансфузиолога Србије са међународним учешћем, Београд 2014. Билтен за трансфузиологију
3. **В.Ћејић, Г.Гузијан, Б.Селак-Ђукелић, Б.Јукић, Д.Радојковић;** Број и врста пријављених трансфузијских реакција у Заводу за трансфузијску медицину

<p>Бања Лука у периоду од 2009-2014.год; 5.Конгрес трансфузиолога Србије са међународним учешћем, Београд 2014. Билтен за трансфузиологију</p> <p>4. Д.Удовчић, Г.Гузијан, Б.Ковачевић, С.Митровић, С.Цимеша; Касна хемолитна трансфузијска реакција узрокована са три антитијела: anti-c, anti-Fy^a i anti-s; 5.Конгрес трансфузиолога Србије са међународним учешћем, Београд 2014. Билтен за трансфузиологију</p> <p>5. Г.Гузијан, Ј.Бојанић, Д.Јојић, Б.Јукић, С.Митровић, В.Ћејић; Дистрибуција клинички значајних еритроцитних антигена у популацији давалаца крви Републике; Scripta medica Banja Luka 2015.</p> <p>6. Ј.Бојанић, Г.Гузијан, Љ.Бојанић, Н.Родић Вукмир, Ј.Аћимовић; Преваленција HIV-а и других полно преносивих инфекција међу сексуалним радницама у Босни и Херцеговини; INDIAN JOURNAL OF APPLIED RESEARCH 2015.</p> <p>7. Д.Јојић, Ј.Предојевић-Самарцић, Г.Гузијан, С.Петровић-Тепић; Имунитет хидропс феталис; Scripta medica Banja Luka 2015.</p> <p>8. В.Ћејић, Б.Јукић, Г.Гузијан, Д.Удовчић; Број и врста трансфузионих реакција у Заводу за трансфузијску медицину Бања Лука у периоду од 2009-2015.год; 25th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion London 2015. Vox Sanguinis</p>
<p>а) Навести неопходне биографске податке: школовање, успјех у току школовања, кретање у служби, резултати научно-истраживачког или стручног рада, јавна признања, друштвене активности и познавање страних језика;</p> <p>б) У прилогу биографије доставити списак објављених научних радова.</p>

2. ЗНАЧАЈ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

<p>Значај истраживања</p> <p>Варијанте антигена D могу да се раздвоје од нормално израженог антигена D серолошким испитивањима која доводе до њихове подјеле на три велике групе: слаби антиген D (weak D), парцијални антиген D и DEL. До сада је откривено више од 200 алела гена <i>RHD</i>, а њихова категоризација направљена је на основу мутација које за резултат имају квалитативне и/или квантитативне промјене у серолошкој изражајности антигена D. Слаби D антиген доказан серолошким техникама или серолошки слаби D фенотип, дефинише се као облик који са анти-D реагенсом даје директну аглутинацију еритроцита јачине $\leq 2+$ у иницијалном тестирању, а умјерену или јаку реакцију аглутинације са антихуман глобулин реагенсом. Многи</p>

облици серолошки слабог D антигена настају као посљедица једне или више замјена аминокиселина у дијелу RhD протеина који је смјештен унутар или испод мембране еритроцита. Сматра се да ове промјене доводе до смањене изражајности антигена на површини еритроцита. Преваленца серолошки доказаног слабог D фенотипа разликује се међу расама и нацијама. Ови облици слабог D антигена су најчешће доказане варијанте D у Европи и Сједињеним Америчким Државама. Процјена је да 0.2% до 1.0% људи бијеле расе наслеђује *RHD* гене који кодирају настанак серолошки слабог D фенотипа. У највећем броју случајева то су слаби D типови 1, 2 и 3. Извјештаји о резултатима преваленце серолошког D фенотипа разликују се у зависности од примјењене методе (ручна метода у епрувети vs. аутоматски аналајзер), употребљеног анти-D реагенса (полиспецифични серум версус моноклонски бленд), као и од употребе појачивача реакције (бромелин). Већина података о *RHD* алелима и ризику од алоимунизације код серолошки слабих D фенотипова проистичу из обсервација студија спроведених у централној Европи. Ове студије указују да примаоци крви који имају слаби D тип 1, 2, или 3, у хомозиготној или хемизиготној форми, нису у ризику да створе анти-D антителијело после примјене RhD позитивних еритроцита. Око 95% особа бијеле расе у централној Европи којима је серолошки утврђен слаби D антиген има слаби D тип 1, 2 или 3. Они се третирају као RhD позитивни и могу да добију трансфузију RhD позитивне крви. Одсуство анти-D антителијела код особа поменутих фенотипова изгледа да је посљедица чињенице да различита алела *RHD* кодира стварање свих епитопа RhD антигена код ових особа у односу на особе са нормално израженим антигеном D, иако је густина антигена на површини еритроцита са слабом D тип 1, 2 или 3 мања него код оних са нормалним D. Анти-D антителијело доказано је код неких других типова слабог антигена D, као што су слаби D тип 4.2, (DAR), тип 11, тип 15, тип 21 и тип 57. Америчка асоцијација банака крви и Колеџ Америчких патолога оформили су Радну групу за *RHD* генотипизацију чији задатак је био да састави препоруке које би дефинисале клиничке индикације за типизацију RhD антигена код особа са серолошки слабом D фенотипом. Радна група је прегледала објављене и необјављене извјештаје, како би утврдила да ли слаби D типови 4.0 и 4.1 могу да добијају RhD позитивну крв без посљедица од алоимунизације. Не постоје објављени радови о доказаним ало или ауто анти-D антителијелима код особа са слабом D тип 4.1 у великим студијама спроведеним у Европи упркос њиховој

учесталости, као и подацима о трансфузиолошком лијечењу RhD позитивним еритроцитима. Радна група је анализирао објављене податке о особама са фенотипом слаби D тип 4.0 које су створиле анти-D антителијело, од којих су три описане у Њемачкој, девет у Француској, једна у Тунису и три у Сједињеним Америчким Државама. Од 16 описаних случајева у Европи само један пацијент је створио алоанти-D антителијело, док је преосталих 15 формирало аутоанти-D. Због свега и нијетог Радна група је ограничила препоруке за примјену RhD позитивне крви искључиво особама са slabим D типовима 1, 2 и 3 док се не прикупи више података.

Истраживања у овој студији дала би одговор на сљедећа питања:

- Да ли у популацији давалаца крви Републике Српске који имају серолошки слабо изражен D антиген, постоје особе којима је молекуларном дијагностиком доказана нека од слабо изражених форми антигена D, која може да створи анти-D антителијело после примјене D позитивне крви?

- Да ли међу даваоцима крви који имају молекуларно доказан слаби облик антигена D постоје ријетки типови или је учесталост испитаног узорка као у осталим испитаним популацијама бијеле расе?

- Да ли међу даваоцима крви који су серолошки RhD негативни постоје особе које су молекуларном фенотипизацијом утврђене као RhD позитивне и као такве могу да створе анти-D антителијело код D негативних примаоца. Требало би направити Регистар таквих особа и измијенити им Rh статус у информационом систему и у књижици добровољног даваоца. Као примаоци крви, ове особе се третирају као RhD негативне и даје им се RhD негативна крв.

- Да ли постоје особе које су примале крв даваоца са молекуларно утврђеним slabим или парцијалним антигеном D, које су створиле анти-D антителијело?

Добијени резултати у овој студији представљаће несумњив допринос прецизном утврђивању RhD статуса давалаца крви, утврђивање учесталости најчешћих облика варијанти антигена D, спречавању имунизације RhD негативних прималаца којима се примјењује крв особа које су серолошки RhD негативне, а молекуларном дијагностиком утврђено присуство RhD антигена. Поред тога, добијени подаци о даваоцима са ријетким типовима slabог и парцијалног антигена D представљају базу за формирање Регистра давалаца крви са ријетким варијантама антигена D и могућност придруживања интернационалним Регистрима ријетких крвних група.

Преглед истраживања:

У поглављу Преглед истраживања Пријаве докторске дисертације јасно су и логички редослиједом описани основни појмови о проблему који се истражује, почев од историјског појма D_u антигена, до савремене подјеле варијанти антигена

Du на слаби и парцијални D антиген.

Кандидат је детаљно објаснио генетску молекуларну основу настанка слабих и парцијалних типова антигена D, као и разлике међу њима. Поред тога, истакао је значај одређивања слабих и парцијалних облика антигена D. Изнео је податке из литературе који говоре о клиничкој примјени ових испитивања, јер особе са облицима слабог D типова 1, 2 и 3 не стварају анти-D антителијело после примјене RhD позитивне крви, па се и третирају као RhD позитивне, док особе са другим типовима слабог D морају да примају RhD негативну крв.

Кандидат је истакао важност утврђивања парцијалних облика антигена D који у серолошким тестирањима могу да се понашају као нормално изражен антиген D, а да створе анти-D антителијело после примјене RhD позитивне крви, или после трудноће са RhD позитивним фетусом.

Веома прецизно и детаљно дати су подаци о дистрибуцији слабих и парцијалних облика антигена D у земљама Европе и свијета, као и стручним ставовима о потреби увођења молекуларног тестирања антигена D у рутински рад, када је ријеч о тестирању давалаца крви и жена у трудноћи.

Дати су савремени стручни ставови о примјени крви одређеног RhD статуса особама са слабим D типовима, као и примјени RhD имунопрофилактике трудницама са одређеним варијантама антигена D.

Поред тога, кандидат је истакао значај предвиђених испитивања и због пренаталних имунохематолошких испитивања и RhD позитивних трудница.

Кандидат др Гордана Гузијан је јасно поставила радне хипотезе са циљевима:

1. Молекуларна фенотипизација требало би да дијагностикује одређене облике како слабих, тако и парцијалних облика антигена D у популацији давалаца крви Републике Српске. Утврдиће се да ли ти слаби облици одговарају слабим типовима 1-3, који су најчешћи у осталим испитаним популацијама бијеле расе. Треба истаћи да је моноклонским анти-D тест серумима често тешко открити слабе облике антигена D, јер антителијела у моноклонским реагенсима имају низак авидитет за њихове епитопе.

2. Очекује се да ће се потврдити претпоставка да ће у популацији давалаца Републике Српске најчешћи облик слабог антигена D одговарати налазима истраживача из Хрватске, с обзиром на историјске и регионалне повезаности, као и миграције на овим просторима. Када је ријеч о парцијалним облицима антигена D, ту се не може са сигурнишћу предвидјети молекуларни налаз, с обзиром на шароликост молекуларних промјена описаних код ових облика D антигена.

3. Доказивање природног или имуног анти-D антителијела код давалаца крви са одређеним облицима слабог, односно парцијалног облика антигена D требало би да буде у сагласју са описаним случајевима доказаног анти-D антителијела код особа са

варијантима D антигена у другим популацијама и извођењем скрининга антителијела типизираним, ензимски третираним еритроцитима, као и индиректног антиглобулинског теста типизираним, ензимски нетретираним еритроцитима. Добијене податке о даваоцима са варијантом антигена D који су створили анти-D антителијело треба упоредити са познатим подацима из литературе, утврдити да ли постоје одступања када је ријеч о облику D антигена код особа које су створила анти-D и направити посебан Регистар ових особа, за случај да и сами буду примаоци крви или су труднице које носе D позитиван фетус.

4. Одговарајуће испитивање *RHD* гена идентификоваће и серолошки D-негативне даваоце, који су у ствари слаб D или DEL, што ће осигурати примјену њихове крви искључиво D-позитивним примаоцима. Без генетске дијагностике, D-негативни примаоци били би и даље имунизовани слабо израженим D-позитивним еритроцитима даваоца.

5. Узимањем узорака крви за скрининг антителијела RhD-негативним примаоцима, Rh фенотипа *ccddee*, који су добијали крв давалаца чији је Rh фенотип био *Ccdee* и *ccddEe* утврдиће се да ли су ови пацијенти створили анти-D антителијело. Практични значај ове анализе је у примјени крви Rh фенотипа *ccddee* особама истог фенотипа, а посебно дјевојчицама и женама у генеративном периоду, прије свега због могућности сензибилизације на C или E антиген, уколико добију крв фенотипова *Ccdee* и *ccddEe*, али и због тога што даваоци крви са овим фенотиповима могу имати и слабо изражен D антиген, који се серолошким методама не може доказати, па су проглашени као RhD-негативни.

6. Код испитиваних давалаца крви Републике Српске са варијантима D требало би доказати сличне молекуларне промјене, као што је описано у литератури. Молекуларном дијагностиком доказано је да је уобичајена одлика 3 најчешћа типа слабог D код особа бијеле расе замјена ексона 4 и 5 у гену *RHD* ексонима 4 и 5 гена *RHCE*. У типу II, ексон 6 је такође замјењен геном *RHCE*, а у типу III ексони 3 и 6 замјењени су дијеловима гена *RHCE*. Увођење молекуларне дијагностике за особе са варијантима антигена D који су даваоци крви, као и формирање Регистра давалаца са slabим D, представља формирање Националне референтне лабораторије за имуногенетику и имунохематологију.

Какао би доказала радне хипотезе, др Гордана Гузијан је поставила сљедеће циљеве истраживања:

Основни циљ ове докторске дисертације је:

Утврдити молекуларним методама да ли даваоци крви у популацији Републике Српске, код којих је серолошки одређен слаб облик антигена D, заиста имају слабо изражен антиген D, парцијални антиген D или комбинацију ова два типа.

Ближи циљеви:

1. Код доказаних слабих и парцијалних облика антигена D, утврдити њихову учесталост и упоредити је са учесталošћу слабих и парцијалних антигена D у другим популацијама бијеле расе;
2. Утврдити да ли код особа са доказаним слабим и парцијалним обликом антигена D постоје оне које су створиле анти-D антителијело и да ли су ти подаци у складу са онима објављеним у стручној литератури;
3. Тестозима молекуларне дијагностике доказати да ли даваоци крви, серолошки утврђени као RhD-негативни, Rh фенотипа Ccddee и ccddEe, имају ген *RHD* и антиген D на еритроцитној мембрани, толико слаб да се не може доказати серолошким техникама, нити доступним анти-D тест серумима;
4. Ретроспективном студијом утврдити RhD-негативне примаоце, Rh фенотипа ccddee, који су примали крв фенотипа Ccddee и ccddEe и утврдити да ли је нека од њих створила анти-D антителијело после примјене крви са назначеним фенотиповима;
5. 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;
6. Постављање базе за Националну референтну лабораторију за имунохематологију и имуногенетику у Заводу за трансфузијску медицину Републике Српске.

Материјал и метод рада;

Испитаници

Током израде докторске дисертације користиће се узорци крви редовних добровољних давалаца, који су серолошким техникама, методом у епрувети, методом у микроплочи и методом у гелу одређени као особе са слабије израженим антигеном D, на основу јачине аглутинације, а према упутству произвођача тест серума.

У бази података Завода за трансфузијску медицину Републике Српске у Бања Луци тренутно постоји 50 особа са доказаним слабијим обликом антигена D, као и 20 RhD-негативних особа Rh фенотипова Ccddee и ccddEe. Према пројекцији Завода за статистику Републике Српске, број становника у Републици Српској је 1 439 673 (подаци се односе на 2013. годину), а у информационом систему Завода за трансфузијску медицину у Бања Луци регистровано је око 5500 давалаца крви. То значи да је проценат давалаца крви у популацији Републике Српске 2,6% а учесталост особа са серолошки утврђеним слабијим D антигеном око 0,9%, а заједно са онима који су Rh фенотипови Ccddee и ccddEe је 1,3% , што је у складу са подацима из литературе .

По два узорка крви узимаће се од сваког испитаника: један у суву, пластичну епрувету у количини од око 5 мл за серолошку потврду RhD статуса испитаника, а један на EDTA у истој количини за молекуларна испитивања.

Тест реагенси за имунохематолошка испитивања добровољних давалаца крви:

За серолошка испитивања користиће се комерцијални полиспецифични антихуманглобулин тест реагенси за испитивање директног и индиректног Coombs-овог теста (у оквиру скрининга, идентификације антитијела и испитивања слабијег D антигена), као и регистровани комерцијални тест серуми анти- D са CE ознаком, који задвољавају критеријуме за одређивање RhD антигена даваоцима, што значи да могу да докажу варијанте DIV, DV i DVI., као и већину D weak фенотипова. Поред тога, користиће се комерцијални тест серуми за одређивање свих антигена Rh фенотипа (анти- C, -c, -E, -e, -C^w). За скрининг и идентификацију антитијела употребљаваће се регистровани комерцијални панели тест еритроцита са познатом дистрибуцијом еритроцитних антигена, као и комерцијални сетови тест серума за доказивање варијанти антигена D. Слаби облици антигена D добијени методом у епрувети, потврђиваће се методом у гелу (BioRad), уз коришћење анти-D тест серума за доказивање слабог D IgG класе истог произвођача, као и методом у микроплочи (апарат Techno, BioRad). Сви тест реагенси морају бити регистровани у Агенцији за лијекове и медицинска средства. Сва имунохематолошка испитивања изводиће се према описаним процедурама.

Методe:

За одређивање крвних група и типизацију еритроцитних антигена користиће се следеће имуносеролошке методе, према описаним стандардним оперативним процедурама:

а) Метода у епрувети или аглутинација у течној средини. Аглутинација у течној средини је најстарија и још увијек је најраспрострањенија метода за откривање еритроцитних антигена и антитијела. Реакција се одиграва у тест епрувети после мијешања суспензије еритроцита и тест серума. За утврђивање присуства или одсуства одређеног антигена користе се тест серуми познате специфичности, а за откривање антитијела еритроцити познатог фенотипа. Метода није стандардизована, па резултат у великој мјери зависи од искуства особља које је изводи.

б) Метода у гелу. Ова метода заснива се на употреби микроцјевчица у којима се налазе партикуле гела. Свака гел картица садржи шест микроепрувета за шест једнаких или различитих тестова. Партикуле гела су сферичне и у тесту имају функцију реакционог медијума и филтера. Оне задржавају аглутинате еритроцита, а пропуштају слободне еритроците на дно. Тиме је олакшано и уједначено читавање резултата реакције партикула гела. Сензитивност теста заснована је на прецизном одмјеравању реактанта, употреби појачивача реакције Ag-At у раствору ниске јонске јачине, ензимом обрађених еритроцита или AHG реагенса. Предности теста су: смањена могућност грешке, уједначенији рад свих извршилаца, боља контрола

квалитета рада, праћење индивидуалног учинка сваког извршиоца је боља, мањи узорци крви (микрометода, што је значајно у педијатрији и у одјељењима интензивне терапије и његе), чистији рад (нема прања еритроцита), могућност инфекције се смањује, контаминација реагенаса је немогућа. Фотографија реакције која се чува је сигурност за пацијента и дио безбједности свих запослених у службама за трансфузију. Суспензије еритроцита су прецизно прописане, пипетирање се врши полуаутоматским пипетама са тачно одређеним волуменима реагенаса, омогућено је инкубирање и центрифугирање ID картица према потреби. Аглутинанти у гелу су постојани и лако уочљиви, тако да је читавање резултата лако и уједначено. Позитиван налаз је црвена линија на површини гела, а негативан када је еритроцитно дугме на дну микроепрувете. Могуће је читање градације аглутинације (од 3+ до \pm), а потпуно је видљиво и мијешано поље. По завршеном центрифугирању, читавање може да се обави одмах, а непромјенљивост резултата је сигурна и после 24 до 48 часова, ако се ID картица чува на $+4^{\circ}\text{C}$ до $+6^{\circ}\text{C}$. Резултати могу бити фотографисани и на тај начин обезбијеђени као трајан медицински документ. Поред тога, олакшано је аутоматизовано читавање резултата и примјена у телекомуникацијама. Микроепрувете испуњене гелом, са или без специфичних тест реагенаса, припремљене за рад чувају се на собној температури, што представља погодност у ванредним ситуацијама. У ID картици постоје три врсте гела: а) гел са специфичним антицијелима, б) гел са АНГ реагенсом, и ц) неутрални гел. За извођење тестова микрометодом аглутинације у гелу потребан је мали узорак крви, тако да може бити кориштен и капиларни узорак. Уколико се процедура поштује, ова метода се показала супериорнијом у доказивању еритроцитних антигена и клинички значајних антиеритроцитних антицијела од конвенционалне методе аглутинације у течној средини. Посебно је повећана могућност откривања слабих антигена и подгрупа, као и нижих концентрација. Фиксација аглутината олакшава и уједначава читавање резултата, а посебно одвајање позитивних од негативних налаза. Принцип теста је директна (слана средина) или индиректна (антихуманглобулин тест) аглутинација еритроцита, са специфичним антицијелима на партикулима гела. Идентификација ирегуларних антицијела је једноставнија, бржа и лакша методом аглутинације у гелу, а посебно је олакшана идентификација мултиплих антицијела у серуму. Ова метода је сензитивнија, а погодна је и за испитивање елуата. Због побројаних предности ову методу употребљава у рутинском раду преко 70% европских трансфузиолошких лабораторија (United Kindom National External Quality Assesment Sheme for Blood Transfusion Laboratory Practice—UK NEQAS) како за испитивање давалаца крви, тако и прималаца крвних компоненти и новорођене дјете.

ц) Метода у микроплочама. Користи се за одређивање еритроцитних антигена или антицијела. Мале количине еритроцита и тест серума се додају у микроепрувете на плочама, које се потом центрифугирају. Еритроцити са дна удубљења ресуспендују се стављањем плоче на мјешалицу или мануелним протресањем плоче, а потом се мануелно или помоћу аутоматског читача врши читавање реакције. У случају негативне реакције еритроцити су у потпуности ресуспендовани у серуму, без

видљивих аглутината.

Утврђивање слабијих облика антигена D имунохематолошким техникама и методама

Када при рутинском тестирању RhD антигена даваоцима крви методом у епрувети изостане директна аглутинација испитиваних еритроцита са употребљеним анти- D тест реагенсом који у себи садржи моноклонска или поликлонска анти-D антителима класе IgG, у мјешавини са моноклонским анти-D антителима класе IgM или је она <2+, испитивање се наставља тестирањем на слаби D (weak D) антиген. Постојање аглутинације након прања испитиваних еритроцита и додавања антихуман глобулин реагенса указује на присуство варијанте антигена D, односно слабог D антигена (weak D), или парцијалног антигена D, а давалац крви се обиљежава као RhD позитиван. Метода у епрувети подразумева постављање позитивне и негативне контроле са еритроцитима познатог RhD статуса, као и употребу Rh контрол реагенса. Испитивани еритроцити су RhD-позитивни ако је резултат директне аглутинације са моноклонским анти- D тест реагенсом методом у гелу од 3+ до 4+, а после испитивања еритроцита са "ID DiaClon Anti-D" тест реагенсом у картицама ID-card "Coombs Anti-IgG или ID Card" "Liss Coombs" аглутинација је јачине 4+; испитивани еритроцити имају слаби или парцијални D антиген ако резултат директне аглутинације са моноклонским анти-D тест реагенсом методом у гелу варира од негативног налаза до 2+, а после испитивања еритроцита са "ID DiaClon Anti-D" тест реагенсом у картицама ID-card "Coombs Anti-IgG или ID Card" "Liss Coombs" аглутинација је јачине од 1+ до 3+.

Молекуларно одређивање крвних група, са посебним освртом на D антиген

Молекуларна дијагностика у смислу доказивања присуства гена *RHD* радиће се свим даваоцима крви који су серолошки потврђени као RhD-негативни, као што је то случај код особа са Ccddee и ccddEe фенотиповима, или оних са серолошки слабо позитивним D антигеном. FluoGene је јединствена метода за молекуларно испитивање HLA, еритроцитних и тромбоцитних гена, која комбинује све предности SSP-PCR, тј. ланчане реакције полимеразе и брзину коју има флуоресцентна детекција као крајња тачка испитивања. Када је ријеч о испитивању гена *RHD*, постоје китови за испитивање особа са јасно израженим D антигеном (CDE kit), којима се утврђује неки од фенотипова парцијалног D, као и извјесни облици слабог D антигена, уз доказивање гена који кодирају антигене Rh фенотипа. Поред ових, постоје китови за одређивање слабих D фенотипова. Анализа се базира на специфично модификованом систему TaqMan® пробе који се детектује у FluoVista апарату произвођача INNO TRAIN GMBH. Предности ове методе су: а)) PCR-SSP метода без електрофорезе у гелу, којом се анализа уради за 90 минута; б) нема хибридизације и поступака прања; ц) приказ добијених резултата је одмах после читавања; д) не постоји ризик од пост- PCR контаминације; е) мали је утробак DNA; е) софтвер је лак за коришћење, са потпуно аутоматским читавањем резултата. Додатне користи FluoGene система укључују могућност теста да се добију резултати узорака ниске концентрације DNAC (<10 ng / µL), као и минималним

ризиком од контаминације узорка, који остаје запечаћен током теста .

Научни допринос истраживања

Студија ће бити истраживачког карактера, прва те врсте у Републици Српској и као таква има фундаменталну значај. Посебно је значајно што ће она имати своју примјену, како у резултатима учесталости различитих варијанти антигена D у здравој популацији Републике Српске, какви су даваоци крви, тако и упоређивању резултата са сличним истраживањима у популацијама других држава.

Поред тога, она омогућава увођење најсавременије методе молекуларне фенотипизације крвних група у рад Завода за трансфузијску медицину Републике Српске, чиме се постављају темељи за формирање Референтне лабораторије за имунохематологију и имуногенетику у Републици Српској. Довољно је рећи да без молекуларне фенотипизације није могуће издати резултате о било ком ријетком еритроцитном фенотипу. Зато је ова докторска дисертација веома значајна, јер омогућава примјену најсавременије дијагностике у формирању Регистра давалаца крвних група у информационој бази података, а нарочито Регистра давалаца ријетких крвних група.

Довољно је рећи да су многе земље западне Европе и свијета увеле молекуларну дијагностику крвних група као једину методу у тестирању крвних група давалаца и трудница, јер је она прецизнија, погодна за стандардизацију и омогућава сигурну интерпретацију резултата.

Утврђивањем особа са варијантама антигена D у популацији серолошки RhD-негативних давалаца крви спријечиће се могућност сензибилизације RhD-негативних прималаца, што је од изузетног клиничког значаја и основни постулат трансфузиолошке науке-примјена безбједне трансфузије.

Очекивани резултати ће послужити за формирање Националног Регистра давалаца крви са ријетким варијантама антигена D, а увођењем методе молекуларне фенотипизације RhD антигена пружа се могућност испитивања и других антигена еритроцита, тромбоцита и HLA антигена, што ће имати изузетан значај у савременом трансфузиолошком лијечењу и трансплантацији ћелија, ткива и органа.

3. ОЦЈЕНА И ПРИЈЕДЛОГ

На основу увида у рад кандидата, приложену документацију, биографију кандидата и списак објављених радова, закључујемо да кандидат прим. мр сц. др мед. Гордана Гузијан испуњава све услове за одобрење теме за израду докторске дисертације у складу са важећим прописима, а посебно са чланом 58, Закона о Универзитету и

Статутом Универзитета у БањаЛуци.

Предложена тема је актуелна, до сада није истраживана на овим просторима, занимљива како са научног, тако и са становишта могућности примјене.

Наведене методе истраживања представљају поуздане технике истраживања помоћу којих је могуће добити значајне резултате.

Чланови Комисије сматрају да постоје реални услови да кандидат успјешно реализује постављене циљеве и да добије значајне оригиналне резултате.

Приједлог теме докторске дисертације прим. мр сц. др Гордане Гузијан под називом „Молекуларна дијагностика варијанти слабијег облика антигена D у популацији давалаца крви Републике Српске“, задовољава све критеријуме за пријаву теме докторске дисертације

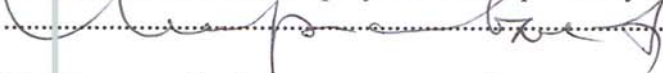
На основу детаљне анализе Пријаве докторске дисертације, чланови Комисије упућују позитивну оцјену Наставно-научном вијећу Медицинског факултета Универзитета у Бања Луци и Сенату Универзитета у Бања Луци и са задовољством предлажу да се позитивна оцјена прихвати и одобри тема под називом: „Молекуларна дијагностика варијанти слабијег облика антигена D у популацији давалаца крви Републике Српске“, те покрене даљи поступак израде докторске дисертације прим. мр сц. др Гордане Гузијан.

ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ:


1. Др Милан Скробић, ванредни професор, ужа научна област Нуклеарна медицина, Медицински факултет Универзитета у Бања Луци, предсједник

.....


2. Др Драгомир Марисављевић, редовни професор, ужа научна област Интерна медицина, Медицински факултет Универзитета у Београду, члан

.....


3. Др Предраг Грубор, редовни професор, ужа научна област Хирургија, Медицински факултет Универзитета у Бања Луци, члан

.....

Prof. dr. PREDRAG GRUBOR

ИЗДВОЈЕНО 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 разлоге због којих не жели да потпише извјештај.