

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA

UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 28.04. 2016. godine, broj 5940/4 imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Ispitivanje efektivnosti i podnošljivosti transfuzija trombocita kod bolesnika uzrasta od jednog meseca do 18 godina”

kandidata mr dr Olivera Šerbić-Nonković, zaposlene u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić" kao lekar specijalista transfuziologije i načelnik Odeljenja za transfuziju krvi. Mentor je Prof. dr Dragana Vujić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Dragomir Marisavljević, redovan profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, predsednik komisije
2. Doc. dr Miloš Kuzmanović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, član komisije
3. Prof. dr Svetlana Vojvodić, vanredni profesor Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu, član komisije

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija, „Ispitivanje efektivnosti i podnošljivosti transfuzija trombocita kod bolesnika uzrasta od jednog meseca do 18 godina” mr sci Olivera Šerbić-Nonković podeljena je u osam poglavlja: uvod (32 strane), ciljevi rada (1 strana), materijal i metode (14 strana), rezultati (23 strane), diskusija (12 strana), zaključci (3 strane), spisak korišćene literature (25 strana) i prilozi (7 strana). Disertacija uključuje ukupno 4 slike, 21 tabelu, 13 grafikona, kao i 187 citata iz naučnih časopisa. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, spisak skraćenica korišćenih u tekstu i podatke o komisiji.

U uvodu su izneti podaci o građi, funkcijama, metabolizmu i interakcijama trombocita, kao i najnovija saznanja o trombocitima kao delu urođenog i adaptivnog imunog sistema. Opisana je etiologija deficita trombocita i indikacije za primenu trombocitnih produkata kod dece. Prikazani su kolekcija, procesiranje, modifikacija, čuvanje trombocitnih produkata i značaj kontrole kvaliteta tokom proizvodnje trombocita. Definisani su faktori značajni za efektivnost transfuzija trombocita, te opisani imuni i neimuni uzroci refrakternosti na transfuzije trombocita. Posebno se ukazuje na rizik primene Rh (D) inkompatibilnih trombocita i mogućnost aloimunizacije ovisno o broju eritrocita u trombocitnom produktu, stepenu imunosupresije primaoca, te merama prevencije. Takođe, dat je jasan prikaz i opisana je patogeneza transfuzijskih reakcija i komplikacija, kao što su: hemolizne reakcije na transfuzije trombocita, febrilne nehemolizne transfuzijske reakcije (FNHTR), alergijske reakcije, pirogene reakcije, transfuzijom izazvano preopterećenje cirkulacije (TACO), i postranfuzijske reakcije sa dispnejom: s transfuzijom povezano akutno oštećenje pluća (TRALI), s transfuzijom povezana dispneja (TAD), s transfuzijom povezana bolest kalema protiv domaćina (Transfuzijski Graft Versus Host Disease - TA-GVHD), kao i Post-transfuzijska purpura (PTP) i transfuzijom izazvana pasivna aloimuna trombocitopenija (PAIT).

Ciljevi rada su precizno definisani. Podrazumevali su ispitivanje učestalosti i etiologiju refrakternosti na transfuzije trombocita, razlikovanje neimune od immune refrakternosti, procenu efektivnosti primenjenih doza trombocita sa negativnom interakcijom. Takođe, cilj je bio utvrđivanje učestalosti alergijskih i febrilnih nehemoliznih transfuzijskih reakcija u ispitivanoj grupi pedijatrijskih bolesnika, određivanje nivoa IL-6 i IL-8 u uzorcima plazme bolesnika i iz doza trombocita koje su izazvale febrilnost kao i utvrđivanje bakterijske kontaminacije trombocitnih produkata i mogućih infekcija kod primalaca trombocita. Jedan od ciljeva je bio da se proceni efektivnost doza trombocita kojima je plazma davaoca zamenjena aditivnim rastvorom za trombocite, posle primene kod bolesnika s alergijskim reakcijama.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da je ispitivanjem obuhvaćeno 239 bolesnika Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić" uzrasta

od jednog meseca do 18 godina, koji su primali transfuzije trombocita u terapijske ili preventivne svrhe, od kojih je 84 ispoljilo transfuzijsku reakciju i/ili refrakternost na transfuzije trombocita. Bolesnici su lečeni u Službi za ispitivanje i lečenje hematoloških i onkoloških bolesnika, Odeljenju za transplantaciju kostne srži sa laboratorijom za kriobiologiju i Službi za pedijatrijsku intenzivnu negu i lečenje. Kontrolnu grupu činila su 155 bolesnika uzrasta od jednog mesec do 18 godina koji su u periodu 2011-2012. godine lečeni na istim odeljenjima Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić", i takođe primali transfuzije trombocita u terapijske ili preventivne svrhe ali nisu ispoljili niti reakcije niti refrakternost na transfuzije trombocita.

Imunoserološki testovi određivanja krvne grupe, direktnog i indirektnog antiglobulin testa, interreakcije na doze trombocita, kao i skrining testovi hemostaze, fibrinogen Klaus, vWF antigen i D-dimeri rađeni su u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić", Odeljenju za transfuziju krvi. Bakteriološko ispitivanje telesnih sekreta i ispitivanje bakterioloških aerobnih i anaerobnih hemokultura bolesnika i hemokultura doza trombocita koje su izazvale transfuzijske reakcije urađeno je u Laboratoriji za kliničku mikrobiologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić. Krvna slika, biohemijski parametri i C reaktivni protein urađeni su u Odseku za kliničku hemiju i hematologiju, a Interleukin 6 u Odseku za laboratorijsku endokrinologiju i skrining programe Biohemijske laboratorije, te nivo imunoglobulina IgA u Laboratoriji za imunologiju i protočnu citometriju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić".

Ispitivanje IL-8 urađeno je u Centru za nuklearnu medicinu Kliničkog Centra Srbije. Detekcija anti-trombocitnih anti-HPA antitela izvršena je u Laboratoriji za tipizaciju tkiva Zavoda za transfuziju krvi Vojvodine a analiza i krosmeč za anti-HLA antitela na Odeljenju za tipizaciju tkiva, u Laboratoriji za HLA tipizaciju Instituta za transfuziju krvi Srbije. Proizvodnja doza trombocita u aditivnom rastvoru za trombocite izvršena je u Institut za transfuziologiju i hemobiologiju Vojno Medicinske Akademije. Sva ispitivanja su bila odobrena od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta u Beogradu i Etičkog odbora u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije "Dr Vukan Čupić".

U poglavlju **Rezultati** su sistematično i detaljno predstavljeni rezultati istraživanja koji se odnose na ispitivanje efektivnosti i podnošljivosti transfuzija trombocita kod dece.

U poglavlju **Diskusija** kandidatkinja je na sveobuhvatan način, jasno i detaljno povezala rezultate svog istraživanja sa rezultatima sličnih istraživanja objavljenih u međunarodnim naučnim časopisima. Rezultati istraživanja o kojima ne postoje dostupni podaci u naučnoj literaturi, objašnjeni su na odgovarajući način. Na osnovu svih ovih razmatranja, kandidatkinja je izvela svoje zaključke i izložila smernice za dalji rad.

U poglavlju **Literatura** navedeno je 156 bibliografskih jedinica, uključujući i tri publikacije kandidata.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Istraživanjima je potvrđeno da je 43 (17.9%) ispitanika ispoljilo refrakternost. Imunu refrakternost razvilo je 51.2% ispitanika. Ispitivanja anti-leukocitnih i anti-trombocitnih antitela pokazala su koliki je stepen aloimunizacije u pedijatrijskoj populaciji, te koje su specifičnosti anti-HPA antitela odgovorna za refrakternost. Procenjena je petogodišnja kumulativna incidenca za anti-HLA i anti-HPA kao i kombinovanu aloimunizaciju s oba antitela. Za nastanak neimune refraktarnosti statistički značajni faktori rizika u sprovedenim istraživanjima su: krvarenje ($p=0.025$), febrilnost ($p=0.038$), mukozna oštećenja ($p=0.045$), lekovi s dejstvom na trombocite $p=0.032$, dijareja ($p=0.002$), autologne transplantacije PMČH ($p=0.003$). Rezultati ispitivanja su pokazali statistički značano niži porast KBT posle 24h kod bolesnika koji su primali ozračene doze trombocita 7.31 ± 9.27 od bolesnika koji su dobijali neozračene doze 9.29 ± 7.37 ($p=0.048$). Terapijski protokoli sa kombinovanom terapijom - citostaticima i ozračivanjem bolesnika predstavljali su značajan etiološki faktor za pojavu refrakternosti. Kandidatkinja je utvrdila postojanje povezanosti između alergijskih transfuzijskih reakcija i refrakternosti na transfuzije trombocita, odnosno da i anti-HLA i anti-HPA antitela mogu aktivirati trombocite i indukovati otpuštanje citokina odgovornih za indukciju alergijskih i febrilnih nehemoliznih transfuzijskih reakcija. Primenom MASPAT testa za interreakcije između doza trombocita i seruma bolesnika kandidatkinja je identifikovala 40.6% kompatibilnih davalaca, a primenom CDC *cross-match* testa utvrdila 32.1% kompatibilnih davalaca. Praćen je porast broja trombocita nakon davanja doze trombocita sa negativnim CDC testom bolesniku sa anti - HLA antitelima, te je kandidatkinja utvrdila značajan porast KBT 1h 24.8, %OT 43.66%.

Rezultati ispitivanja ukazuju da je 70 transfuzijskih reakcija registrovano kod 51 bolesnika (21.7%) i to: alergijske transfuzijske reakcije 51 (72.8%), febrilne nehemolizne transfuzijske reakcije - FNHTR 12 manifestacija (17,1%), jedna hipotenzivna reakcija (1.4%), po jedna anafilaksna i s transfuzijom povezana dispneja - TAD, i četiri reakcije (5.7%) sa kombinovanim simptomima: alergijska reakcijom sa simptomima od strane gastrointestinalnog trakta - abdominalnim kolikama, alergijska reakcija sa mučninom i emezisom, dve alergijske reakcije sa FNHTR. Zapaženo je da su koncentracije trombocita iz BC odgovorni za najveći broj reakcija 73.5%, (od toga 59.2% je bilo ne ozračenih a 14.3% ozračenih koncentrata trombocita iz BC). Pojava neželjenih reakcija rasla je sa starijim uzrastom bolesnika. Procenjena je petogodišnja kumulativna incidenca svih neželjenih reakcija, alergijskih reakcija i FNHTR u odnosu na broj doza i u odnosu na količinu trombocitnih produkata u mlilitru.

Određivanje vrednosti citokina , IL-6 i IL-8, ukazalo je da su značajno veće vrednosti IL-6 posle transfuzije registrovane kod bolesnika koji su imali infekciju, kao i da je postojala korelacija između vrednosti C reaktivnog proteina i IL-6. Sprovedenim ispitivanjima utvrđeno je da su vrednosti IL-8 u jedinicama trombocita čija je primena bila praćena transfuzijskim reakcijama bile značajno više ($p=0.001$) nego u kontrolnim jedinicama

trombocita. Rezultati ispitivanja ponovljenih transfuzijskih reakcija ukazali su da ako je prva reakcija bila alergijska 57.1% bolesnika ponovo dobije alergijsku reakciju, ako je prva reakcija bila FNHTR, 60% bolesnika je ponovo ispoljilo FNHTR.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U poređenju sa podacima iz literature (Kumara i sar. 2015.), gde se navodi da su kod 18-66% bolesnika sa malignim oboljenjima hemotopoeznog sistema primenjivane profilaktičke transfuzije trombocita, kandidatkinja je našla da je 71,6% ispitivanih bolesnika profilaktički dobijalo transfuzije trombocita. Problem refrakternosti na transfuzije trombocita javlja se kod 27-50% bolesnika (Brouk i sar. 2015, Lavoie J. i sar. 2011), a ne imuna refrakternost do 30% (Ferreira i sar 2011). U grupi bolesnika koja je obuhvaćena sprovedenim ispitivanjima refrakternost na transfuzije trombocita ima manju ukupnu incidencu ali je učestalost ne immune refrakternosti veća. Dobijeni rezultati ispitivanja su u saglasnosti sa radom Li i sar. (2011) koji je prikazao grupu od 69 bolesnika koji su razvili refrakternost na transfuzije trombocita posle transplantacije perifernih matičnih ćelija hematopoeze. Najčešći razlozi za refrakternost bili su takođe neimmune prirode: infekcije, krvarenje i febrilnost. Problem refrakternosti na transfuzije trombocita nedovoljno je obrađivan kod dece uzrasta do 18 godina tako da su poređenja moguća u odnosu na adultnu populaciju. HLA aloimunizacija je poređena sa studijom Fasana i sar. (2014.) a HPA aloimuizacija sa studijom Jia i sar. (2014.) Povezanost imune refrakternosti i pojave transfuzijskih reakcija opisali su i drugi autori. Moncharmont P. i sar. (2014.)

Prema Kerkhoffs i sar. (2008) kod refrakternosti na transfuzije trombocita hemoragijske komplikacije javljaju se kod 19% bolesnika, dok je u ispitivanoj grupi kandidatkinja utvrdila da iznose 30,2%. Kandidatkinja je utvrdila petogodišnju kumulativnu incidencu za alergijske (1.7/1000) i za febrilne reakcije (0.4/1000) za ispitivanu grupu bolesnika, koja je u saglasnosti s literaturnim podacima za adultnu populaciju.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Olivera Šerbić Nonković, Miloš Kuzmanović, Maja Životić, Svetlana Žunić, Dragana Jovičić Gojkov, Dragana Vujić. Independent role of interleukin IL-6 and IL-8 in the etiology of transfusion reactions to platelet concentrates in children Vojnosanit Pregl 2016; 73().

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija pod nazivom **Ispitivanje efektivnosti i podnošljivosti transfuzija trombocita kod bolesnika uzrasta od jednog meseca do 18 godina** dr Olivera Šerbić Nonković predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju mehanizama koji učestvuju u patogenezi refrakternosti na transfuzije trombocita i nastanka transfuzijskih reakcija. Svi segmenti ove doktorske disertacije odlično su

usklađeni sa postavljenim ciljevima istraživanja, koji su precizno definisani i aktuelni iz aspekta savremenih pravaca razvoja medicinske nauke. Ovim istraživanjem utemeljen je protokol ispitivanja aloimune refrakternosti kod bolesnika uzrasta do 18 godina.

Ovo istraživanje ima značajna inovativna naučna saznanja. Rezultati disertacije daju jasne smernice za prevazilaženje problema refrakternosti na transfuzije trombocita. Kandidatkinja iznosi i iskustvo u primeni aditivnih rastvora za trombocite, kojima se zamenjuje plazma, kod bolesnika koji su imali alergijske reakcije tokom transfuzije trombocita, što je po prvi urađeno u Srbiji za zbrinjavanje bolesnika uzrasta do 18 godina i time predstavlja značajan doprinos u transfuzijskoj medicini u Srbiji.

Doktorska disertacija dr Olivera Šerbić Nonković urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Olivera Šerbić-Nonković i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 06.07. 2016.

Članovi Komisije:

Prof. dr Dragomir Marisavljević

Doc. dr Miloš Kuzmanović

Prof. dr Svetlana Vojvodić

Mentor:

Prof. dr Dragana Vujić
