

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 15.05.2017. godine, broj 5940/10, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Pore enje subklini ke nefrotoksi nosti izazvane gadolinijumom i jodnim kontrastnim sredstvom kod dece sa normalnom bubrežnom funkcijom“

kandidata dr Brankice Spasojevi -Dimitrijeve, zaposlene u Službi nefrologije Univerzitetske de je klinike u Beogradu. Mentor je Prof.dr Mirjana Kostić .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Biljana Stojimirović , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof.dr Jelena Kotur-Stevuljević , profesor Farmaceutskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Amira Peco-Antić , profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu u penziji

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Brankice Spasojevi -Dimitrijeve napisana je na ukupno 105 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 12 tabela i 23 grafikona. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skra enica koriš enih u tekstu.

U **uvodu** je navedeno akutno ošte enje bubrežne funkcije prema najnovijim definicijama, sa posebnim osvrtom na ošte enje posle primene kontrasta (“Contrast induced acute kidney injury”, CI-AKI). Navedene su sve manjkavosti tradicionalnih parametara procene bubrežnog ošte enja kao što su serumski kreatinin i ja ina glomerulske filtracije. Pored ovih tradicionalnih parametara bubrežne funkcije, opisan je i zna aj serumskog cistatina C u proceni bubrežnog ošte enja. Detaljno je opisan i novi pojam subklini kog ošte enja

bubrežne funkcije koji podrazumeva nastanak strukturnog uz izostanak funkcionalnog ošte enja bubrežne funkcije, a koje pri tome može biti otkriveno upotrebom novih biomarkera poput “neutrophil gelatinase-associated lipocalin-a”, NGAL i “kidney injury molecule-1”, KIM-1. Tako e je prikazan detaljan osvrt na dve grupe kontrastnih sredstava: na bazi joda i na bazi gadolinijuma. Navedena su dosadašnja saznanja vezana za nastanak nefrotoksi nosti posle primene ovih kontrasta kako u eksperimentalnim uslovima, tako i u adultnoj i pedijatrijskoj populaciji. I na kraju uvoda, opisanu su i potencijalne mere prevencije u nastanku nefrotoksi nosti.

Ciljevi rada su precizno definisani. Kao glavni ciljevi istraživanja su postavljena ispitivanja subklini kog i eventualnog klini kog (CI-AKI) ošte enja bubrega kod dece sa normalnom bubrežnom funkcijom posle primene kontrasta na bazi gadolinijuma i joda. Tako e kao cilj rada navedena je i procena prediktivnosti cistatna C i novih biomarkera u nastanku CI-AKI, kao i zna aj intravenske rehidracije, doze i koli ine primenjenog kontrasta na nastanak bubrežnog ošte enja.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se radi o prospektivnom istraživanju koje je sprovedeno na Univerzitetskoj klinici u Beogradu. Detaljno je opisan protokol studije i podela ispitanika na dve grupe prema vrsti primenjenog kontrastnog sredstva, kao i kriterijumi za uklju enje i za isklju enje iz studije. Prva grupa ispitanika je tokom kateterizacije srca primila jodni kontrast iopromide, a druga tokom MR angiografije/urografije, gadolinijumski Gd-DTPA. Ispitanicima su u cilju procene nefrotoksi nosti, uzorci krvi i urina uzimani pre snimanja, potom su urini uzimani u još tri vremena (posle 4h, 24h, i 48h), a uzorci krvi u dva vremena (posle 24h i 48h) posle snimanja. Ova studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom, a odobrena je i od strane Eti kog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Roditelji ili zakonski staratelji ispitanika, kao i ispitanici sa navršениh 18 godina su dali pisani pristanak pre uklju enja u studiju.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaklju ci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Koriš ena **literatura** sadrži spisak od 170 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Posle 24 sata od primene dve različite vrste kontrasta kod dece sa normalnom bubrežnom funkcijom zabeležena je tranzitorna razlika u srednjoj vrednosti glomerulske filtracije (eGFR) i serumskog kreatinina. Pacijenti koji su primili iopromide su imali izraženiji pad eGFR (eGFR 10,77 (21,24) ml/min/1,73m²) u poređenju sa pacijentima koji su kao kontrastno sredstvo primili Gd-DTPA, (eGFR 5,93 (21,23) ml/min/1,73m²). Za razliku od cistatina C koji se nije menjao kroz vreme u obe grupe kontrasta, u grupi pacijenata koja je primala iopromide, posle 24h od ekspozicije kontrastu, serumski kreatinin je značajnije porastao u odnosu na grupu koja je primila Gd-DTPA (creatinine 6,0 (10,0) μmol/l, P= 0.03; creatinine 4,0 (12,0) μmol/l, P=0,027). Međutim posle 48 sati, zabeleženi su slični nalazi, ali ovog puta bez statistički značajne razlike među grupama kontrasta. Vrednosti FE_{Na} i FE_K su posle 24 sata od primene jednog kontrasta bile statistički značajno niže u odnosu na bazalne, a vrednosti TRP i glikozurije su istovremeno u obe kontrastne grupe beležile tranzitorni porast. Posle 24 sata od primene kontrasta, serumski NGAL je imao veći porast u grupi koja je primala jodni kontrast i ovaj porast je i dostigao statističku značajnost (iopromide: sNGAL 4,3 (16,55) ng/ml, P=0,032; Gd-DTPA: sNGAL 0,7(16,6) ng/ml, P=0,783). U isto vreme, porast serumskog NGAL za 25% u odnosu na bazalne vrednosti je zabeležen kod 32,6% ispitanika koji su primili iopromide i kod 25,5% ispitanika koji su primili Gd-DTPA. Srednji porast serumskog NGAL-a u ove dve subgrupe ispitanika je bio 62,23% u grupi koja je dobila jodni kontrast i 36,44% u grupi koja je primila Gd-DTPA (p= 0,002). Posle 48 sati od primene kontrasta, urinarni KIM-1 je porastao značajnije u grupi koja je primila Gd-DTPA (Gd-DTPA: uKIM-1 50,9 (200,7) pg/ml, P=0,015; iopromide: uKIM-1 34,5 (210,45) pg/ml, P=0,23). Međugrupna razlika u procentu porasta uKIM-1 je takođe bila statistički značajna (P=0,012). Celokupna incidenca CI-AKI, definisana na osnovu novih kriterijuma koji uzimaju u obzir pad eGFR za više od >25%, ili porast serumskog kreatinina takođe za više od 25% (ili najmanje za 26,5 μmol/l) u odnosu na bazalne vrednosti unutar 48 sati od ekspozicije kontrastu u celoj grupi ispitanika je bila 6,5%, tj. CI-AKI je dijagnostikovana kod 8 od 123 ispitanika. U grupi ispitanika koji su dobili jodni kontrast, dva (3,9%) su dijagnostikovani kao CI-AKI, a u grupi koja su primila Gd-DTPA bilo je šest ispitanika sa CI-AKI ili 9,7% (p=0,29). Dakle, incidenca CI-AKI je bila veća u grupi ispitanika koja je dobijala Gd-DTPA, ali ova razlika nije dostigla statističku značajnost. Samo je porast urinarnog KIM-1 posle 24 sata od ekspozicije kontrastu bio značajno veći u grupi ispitanika sa dijagnostikovanom CI-AKI (CI-AKI: 367,3 (221,5) pg/ml; ne CI-AKI: 308,2 (192,1)

pg/ml, $p=0,009$). Rezultati ROC analize za normalizovane vrednosti uKIM-1 su pokazale da je AUC uKIM-1/uCr posle 24 sata od ekspozicije kontrastu 0,757 (95% interval pouzdanosti [CI]:0,629-0,885; $P=0,035$). Posle 24 sata od ekspozicije kontrastu, vrednosti KIM-1/uCr za ranu detekciju CI-AKI ve e od 214 pg/mg su pokazale senzitivnost od 83,3 % i specifi nost od 54,2%. Dva ispitanika sa CI-AKI u grupi jodnog kontrastnog sredstva su primili nešto ve u koli inu kontrasta u odnosu na one koji u ovoj grupi nisu razvili CI-AKI (CI-AKI: 3,105 ml/kg; ne CI-AKI: $2,89\pm 2,21$ ml/kg), $p>0,05$). U grupi ispitanika koji su dobijali kontrast na bazi gadolinijuma, nije bilo razlike u koli ini primenjenog kontrasta izme u onih koji su razvili CI-AKI i onih koji za to nisu imali kriterijum (CI-AKI: $0,19\pm 0,01$ ml/kg; ne CI-AKI: $0,21\pm 0,02$). Tako e, nije postojala razlika u dužini intravenske hidracije pre, tokom trajanja procedure, kao i posle ekspozicije kontrastu izme u ispitanika sa i bez dijagnostikovane CI-AKI. U estalost primene ACEI/ARB i drugih antihipertenzivnih lekova je bila sli na u obe grupe ispitanika.

C) Uperedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Akutno ošte enje bubrežne funkcije izazvano primenom jodnih kontrasta („radiocontrast media-induced acute kidney injury“, CI-AKI) je do sada dobro opisano i predstavlja estu pojava kod osoba koje poseduju odre ene faktore rizika. Postoje razli iti izveštaji o tome da li ili ne koli ina primenjenog kontrasta determiniše nastanak CI-AKI. Manje prospektivne studije nisu potvrdile ovu udruženost (Mason RA i sar., 1985) dok su velike retrospektivne analize baza podataka potvrdile udruženost koli ine kontrasta i rizika za nastanak AKI (Freeman RV i sar., 2002). Doza kontrasta je kod oba pacijenta u ovom ispitivanju koji su razvili CI-AKI posle primene iopromide-a iznosila 3,1 ml/kg tt, što je bilo za nijansu više od grupnog proseka. S obzirom da su svega dva pacijenta razvili CI-AKI, nije mogao da da se donese bilo kakav validan statisti ki zaklju ak.

Obzirom da kontrasti na bazi gadolinijuma imaju veoma sli ne karakteristike kao i jodni, posebno hiperosmolarnost i klirens ovisan o glomerulskoj filtraciji, nefrotoksi nost ovih preparata nije u potpunosti zanemarljiva. Arsenault i sar., (Arsenault TM, 1996) su ispitivali pacijenate sa srednjom vrednosti serumskog kreatinina od 2,5 mg/dl koji su primili 0,1 mmol/kg gadopentetata. Tre eg dana autori nisu zabeležili promenu serumskog kreatinina ukazuju i na odsustvo nefrotoksi nosti helata gadolinijuma primenjenog u maloj dozi. U ovoj studiji, u grupi pacijenata kod kojih je primenjen isti kontrast u istoj prose noj dozi kao i u radu prethodno navedenih autora, pokazano je da je srednji kreatinin od po etnih $66,5\pm 18$

$\mu\text{mol/l}$, porastao na $69,6 \pm 18,7 \mu\text{mol/l}$, sa razlikom koja je bila statistički značajna. Moguće da ovaj neekvivalentni porast u grupi dece sa normalnom bubrežnom funkcijom, potiče od činjenice da je u ovom radu kreatinin meren posle 48h, a ne posle 72h.

Pokazano je da su dvoje od 58-oro ili 3,4% dece koja su primila iopromide i šestoro od 65-oro ili 9,2% dece koji su primili Gd-DTPA razvili CI-AKI, ali bez statističke značajnosti među grupama kontrasta. Ovo je naravno u grupi dece sa normalnom bubrežnom funkcijom veoma visok procenat, pogotovo neekvivalentno visok u grupi koja je primala gadolinijum. Rečeno je verovatno o tome što su primenjeni najnoviji, tj. najstrožiji kriterijumi za dijagnostiku AKI. Međutim, ovo je slično izveštaju Duan. a i sar. iz 2013., doduše u populaciji starijih ispitanika, takođe sa normalnom bubrežnom funkcijom. Navedeni autori su pokazali da je 8 od 60 (13,3%) pacijenata posle kontrastnog snimanja na MR razvilo CI-AKI. Kada je rečeno o primeni jednog kontrasta, obzirom da su samo dva pacijenta koja su primila iopromid imala kriterijum za dijagnozu CI-AKI, naši rezultati potvrđuju ranija zapažanja da nisko-osmolarni, nejonski kontrasti za intravaskularnu primenu, retko dovode do AKI. Slične rezultate je prikazao Hwang i sar. iz 2014., u kohorti od 26 dece sa urološnim srčanim manama kojima je rađena kateterizacija srca. U njihovoj grupi, CI-AKI nije zabeležen niti kod jednog pacijenta. Lichosik i sar. (2015.), takođe nisu zabeležili slučajeve klasične nefrotoksičnosti u grupi dece sa normalnom ili lako narušenom bubrežnom funkcijom koja su primala intravenski iohexol prilikom radioloških ispitivanja. U grupi dece kod kojih je primenjen jodni kontrast u ovoj studiji, zabeleženo je prolazno (samo posle 24 sata), ali statistički značajno smanjenje natriureze, što je u skladu sa nekim ranijim nalazima (Tumlin J i sar., 2006). U grupi dece koja su kao kontrast dobijala Gd-DTPA posle 48h je zabeležen blagi porast proteinurije i mikroalbuminurije u odnosu na bazalne vrednosti (bez statističke značajnosti). Takođe su Levin i sar. (2007.) pokazali da kontrastna sredstva mogu dovesti do pogoršanja albuminurije, a da NAC kao potencijalni nefroprotektivni agens sa antioksidativnim delovanjem može da dovede do njenog smanjenja. U ovoj studiji, kod dece sa normalnom bubrežnom funkcijom, posle primene bilo kog od dva kontrasta nije zabeležena, niti posle 24h, niti posle 48h značajna promena u serumskoj koncentraciji cistatina C. Ovaj nalaz je u suprotnosti sa adultnim studijama posle koronarnih angiografija, doduše kod pacijenata sa CKD, gde se cistatin C pokazao kao senzitivniji i raniji marker za nastanak CI-AKI od serumskog kreatinina i promene GFR (Briguori C i sar., 2010, Ebru AE i sar., 2014).

Kada je rečeno o analizi novih biomarkera posle kontrastnih snimanja, Hirsch i sar., su 2007. godine bili prvi autori koji su izučavali koncentracije NGAL u serumu i u urinu dece

kojima je ra ena kontrastna kateterizacija srca pokazali da ovaj biomarker može biti signifikantan prediktor u nastanku AKI. U ovoj studiji, nije došlo do porasta urinarnog NGAL unutar 4h od ekspozicije bilo kojem od dva ispitivana kontrastna sredstva . Pretpostavlja da je ova razlika u odnosu na literaturne podake u grupi dece koja su primala iopromid proistekla iz injenice da je bilo veoma malo pacijenata sa definitivnom CI-AKI (svega dva) i da je korišten nisko-osmolarni, ne-jonski jodni kontrast u maloj dozi, kao i da nije bilo dece sa cijanogenim sr anim manama, u pore enju sa prethodnim studijama (Hirsch R i sar.,2007). Tako e, Alharazi i sar. (2014), u studiji koja je obuhvatila pacijenate sa CKD kojima je ra ena koronarna angiografija, našli su potpuno suprotno prethodnim studijama, da se serumski NGAL ne menja kod njihovih pacijenata etvrtog sata od snimanja. Autori su pretpostavili da je razlog tome primena standardnog rehidracionog protokola uz profilaksu peroralnim NAC-om. Intravenska rehidracija primenjena kod ve ine pacijenata u Gd-DTPA grupi ove studije, mogla bi biti objašnjenje zašto je urinarni NGAL posle 4 sata od primene kontrasta ak i niži u odnosu na bazalne vrednosti. Do danas, pojam subklini ke nefrotoksi nosti nije jasno definisan. Akrawinthawong K. i sar. (2015.), su subklini ku nefrotoksi nost definisali dvostrukim ili pak ve im porastom NGAL-a, i pokazali su da pored 12,7% pacijenata sa CKD koji razvije standardne kriterijume za CI-AKI, njih dodatnih 11,1% razvije subklini ku nefrotoksi nost posle koronarne angiografije. U ovoj studiji je zabeležen porast i serumskog i urinarnog NGAL-a 24 sata posle primene oba kontrasta, ali je samo statisti ku zna ajnost dostigao porast serumskog NGAL-a posle primene jodnog kontrasta ($p=0,032$). Sli no Khatami-ju i koaturima (2015), u ovom radu je pokušano da se suptilne strukturne promene u bubregu (subklini ke) posle primene kontrastnih sredstava, izraze pomo u porasta novih biomarkera za 25% u odnosu na bazalne vrednosti. Serumski NGAL je posle 24 sata od primene jodnog kontrasta porastao za preko 25% u 32,6% pacijenata,a u 25,45% pacijenata posle primene Gd-DTPA. Prose an porast u ove dve subgrupe pacijenata je bio statisti ki zna ajno ve i u grupi koja je primila iopromide i iznosio je 62,23%, za razliku od grupe koja je primila Gd-DTPA gde je iznosio 36,44% ($p=0,002$). Han i sar., (2008). su tako e opisali da je urinarni KIM-1, 12h posle kardiohirurške intervencije prediktivni faktor nastanka AKI kod dece. U studiji Akdeniz i sar. iz 2015, uKIM-1 se pokazao kao koristan marker za ranu dijagnozu CI-AKI posle koronarne angiografije. U ovoj studiji je pokazano da je ekskrecija urinarnog KIM-1, 24 sata posle primene helata gadolinijuma bila statisti ki zna ajno ve a u grupi koja je razvila CI-AKI u odnosu na grupu koja nije. Tako e, u studiji Duan-a i sar. (2013)., logisti kom regresionom analizom je pokazano da su urinarni KIM-1 i IL-16 24 sata posle injekcije gadolinijuma nezavisni

prediktivni markeri za nastanak CI-AKI. Značajan porast u KIM-1 i normalizovanog uKIM posle 24 i 48 časova u populaciji pedijatrijskih pacijenata posle primene Gd-DTPA, kao i njegov prediktivni značaj za nastanak CI-AKI kao neinvazivnog markera, je interesantan nalaz koji zahteva dalja istraživanja na većem uzorku dece.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Brankica Spasojević -Dimitrijeva, Jelena Kotur-Stevuljević, Milan Čukić, Dušan Paripović, Gordana Miloševski-Lomić, Vesna Spasojević -Kalimanovska, Polina Pavićević, Jadranka Mitrović, Mirjana Kostić. Serum Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and Urinary Kidney Injury Molecule-1 as Potential Biomarkers of Subclinical Nephrotoxicity After Gadolinium-Based and Iodinated-Based Contrast Media Exposure in Pediatric Patients with Normal Kidney Function. Med Sci Mon (2017),DOI:10.12659/MSM.903255

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija "Poređenje subkliničke nefrotoksičnosti izazvane gadolinijumom i jodnim kontrastnim sredstvom kod dece sa normalnom bubrežnom funkcijom" dr Brankice Spasojević -Dimitrijeve, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u otkrivanju nastanka subkliničke toksičnosti posle primene kako jodnih, tako i kontrastnih sredstava na bazi gadolinijuma. U literaturi, ne mogu da se nađu podaci o istraživanju i poređenju subkliničke CI-AKI u populaciji dece sa normalnom bubrežnom funkcijom koja su primali dva različita kontrastna sredstva (iz grupe jodnih i gadolinijumskih kontrasta). Na dijagnozu subkliničke AKI može danas lako da se posumnja zahvaljujući merenju dostupnih markera tubulskog oštećenja. Sekvencionalna merenja biomarkera mogu biti dalje u pomoć i da se odredi trend bubrežnog insulta, da li je bio prolazan ili pak još uvek perzistira. Ovo može probiti nove granice u dijagnozi kako AKI, tako i njenih posledica, a samim tim i u izučavanju preventivnih i terapijskih strategija. Literaturni podaci koji se odnose na protektivne mere nastanka CI-AKI kao što su primena većeg volumena tečnosti, izo-osmolarnih kontrasta, N-acetilcisteina i/ili infuzije sa bikarbonatima kao i preventivnih ekstrakorporalnih terapijskih mera, trebalo bi da se u budućnosti evaluiraju u svetlu ovih novih kriterijuma. Rad predstavlja doprinos novijim mišljenjima da gadolinijumske kontraste treba davati sa oprezom i da ih ne treba smatrati nefrotoksičnom zamenom za jodna. Naime, i kod dece sa normalnom bubrežnom funkcijom, posle primene Gd-DTPA dolazi do

značajnog porasta urinarnog KIM-1, a tako je i do ne tako beznačajnog procenta u nastanku CI-AKI (9,2%). Tako je, normalizovana vrednost urinarnog KIM-1 može predstavljati rani prediktor nastanka CI-AKI. Ovaj nalaz svakako zahteva dalja opsežnija istraživanja.

Ova doktorska disertacija je 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 vešću u Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Brankice Spasojević-Dimitrijević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 15.06.2017.

Članovi Komisije:

Prof. dr Biljana Stojimirović

Prof. dr Jelena Kotur-Stevuljević

Prof.dr Amira Peco-Antić

Mentor:

Prof.dr Mirjana Kostić
