

## NAUČNO IZVEŠTAJE U MEDICINSKOG FAKULTETA

### UNIVERZITETA U BEOGRADU

Naučno izveštaje Medicinskog Fakulteta u Beogradu na sednici od 16. 06 2015g donelo je odluku za produženje roka za izradu i odbranu doktorske disertacije mr. dr Biljane Pejovi pod nazivom : **“RANO OTKRIVANJE AKUTNOG OŠTEĆENJA BUBREGA KOD PRETERMINSKOG NOVOROĐENETA POMOĆU URINARNIH BIOMARKERA”** mentor doktorske disertacije je Prof. dr Amira Peco-Anti , redovni profesor na katedri za pedijatriju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, sada u penziji.

Predloženi članovi komisije su:

- 1.Prof. dr Marija Luka , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
- 2.Prof. dr Mladenko Vasiljevi , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
- 3.Prof. dr Jelena Kotur Stevuljevi , vanredni profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

### IZVEŠTAJ

#### PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dr. Biljane Pejovi pod nazivom **“RANO OTKRIVANJE AKUTNOG OŠTEĆENJA BUBREGA KOD PRETERMINSKOG NOVOROĐENETA POMOĆU URINARNIH BIOMARKERA”** napisana je na 184 strana i sadrži 41 tabela i 30 grafikona. Doktorska disertacija je podeljena na sledeća poglavlja : Uvod, Ciljevi rada, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključak i Literatura. Na početku rada se nalazi sažetak na srpskom jeziku, sažetak na engleskom jeziku, spisak skraćenica korišćenih u radu a na kraju i biografija kandidata.

**Uvod** sadrži 39 strana i više celina u kojima su izneti najznačajniji podaci o akutnom oštećenju bubrega (AKI) kod novorođenadi, konvencionalnim biomarkerima, novim biomarkerima, pre svega onim koji su ispitivani u radu. Istaknut je značaj AKI kod novorođenadi, posebno kod prevremeno rođene. Ukazano je na etiologiju i povezanost perinatalne asfiksije i AKI, kao jednog od najčešćih uzroka AKI kod novorođeneta. Dat je opis patofizioloških mehanizama u nastanku akutne bubrežne insuficijencije, ukazano na specifičnost bubrega novorođeneta, njegovu nezrelost, aktuelnu postnatalnu nefrogenezu kod prevremeno rođene dece, kao i na značaj oksidativnog stresa u nastanku oštećenja bubrega. Detaljno je iznet postojanje i problem ograničenja dosadašnjih dijagnostičkih mogućnosti koje se temelje na vrednostima serumskog kreatinina i diureze, od kojih su oba nesavršeni markeri AKI novorođeneta. Iznete su osobine kreatinina zbog kojih dijagnostika AKI obično kasni i specifičnosti diureze u prvim postnatalnim, satima i danima, koja je često odložena, oskudna i može biti neregistrovana. U uvodnom delu iznete su prednosti novih biomarkera bubrežnog oštećenja. Osnovna uloga ovih biomarkera je da rano dijagnostikuju AKI ali pored toga imaju i još nekoliko značajnih osobina: mogu da posluže za razlikovanje podtipova AKI, za identifikovanje etiologije AKI, za razlikovanje AKI od drugih formi akutnih bubrežnih oboljenja, za procenu težine AKI, za praćenje pravca razvoja AKI kao i za praćenje odgovora na terapiju. Veoma važan deo uvoda posvećen je novim klasifikacionim sistemima AKI (RIFLE; pRIFLE, AKIN, KDIGO), koji omogućavaju brže i jednostavnije registrovanje i lečenje ovoga problema.

**Ciljevi istraživanja** su precizno navedeni. Glavni ciljevi ove doktorske disertacije su bili da utvrdi uestalost akutnog oštećenja bubrega kod pretermijske novorođenadi sa umereno teškom prenatalnom asfiksijom i da pokaže prednosti novih serumskih [cistatin C (CysC) i neutrofilni želatinozni lipokalin (NGAL)] i urinarnih [NGAL, molekul 1 bubrežnog oštećenja (KIM-1), alfa1 mikroglobulin (α1M) i beta-2 mikroglobulin (β2M)] biomarkera u odnosu na standardne biohemijske markere bubrežnog oštećenja pretermijskog novorođeneta.

**Materijal i metode** je poglavlje koji sadrži 13 strana i u kome su jasno i detaljno opisane sve metode koje su korišćene u izradi ovog rada. Definisani su kriterijumi za uključivanje i isključivanje novorođenadi u studiju, metode istraživanja i statističke analize. Detaljno je opisan način prikupljanja bioloških materijala za analizu urina i krvi, vremenske tačke koje su strogo poštovane, način uvanja materijala i analiza odnosno merenje starih i novih biomarkera.

Studija je odobrena od strane Eti kog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Pored toga, ova studija ima saglasnost i od strane Eti kog odbora Instituta za neonatologiju, Beograd, zavedena pod brojem 24/6-2. Svi ispitanici su dali pisanu saglasnost za učešće u studiji, na posebnom formularu koji sadrži informacije o akutnoj bubrežnoj insuficijenciji kod novorođenadi, značajnog otkrivanja i lečenja, potrebi daljeg istraživanja. Svim ispitanicima je učinjen ultrasonografski pregled abdomena, srca i velikih krvnih sudova i centralnog nervnog sistema. Svima je po protokolu studije u prvom danu života (DAN1) određena vrednost serum kreatinina, elektrolitni i acido-bazni status, precizno sakupljan urin i pripreman za uvođenje do analize biomarkera. U prvom danu su uzeta tri uzorka krvi i urina u drugom, četvrtom i šestom satu po prijemu u bolnicu. Iste analize su ponovljene jedan put u trećem i sedmom danu hospitalizacije. U navedenih pet takva ispitivanja su određivane paralelno vrednosti starih i novih biomarkera. Od novih u urinu su merene koncentracije uNGAL, KIM-1, TIMP-1 i  $\beta$ -M kao i urinarni kreatinin. U serumu su određivane vrednosti NGAL (sNGAL), CysC, serumski kreatinin, urea i elektrolitni i acido-bazni status. Osnovne analize, stari biomarkeri, su mereni u biohemijskoj laboratoriji Instituta za neonatologiju u Beogradu a novi biomarkeri su mereni u Laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Samo su vrednosti TIMP-1 mikroglobulina i TIMP-2 mikroglobulina određene u laboratoriji Hexalab u Beogradu. Naknadna merenja biomarkera su dala vrednosti koje smo statističkom analizom obradili i napravili poređenje sa starim biomarkerima, izračunali njihove granice (cut-off) vrednosti i prediktivne sposobnosti kao vrednost AUC-ROC i takođe pokazali njihovu zavisnost od gestacijske i postnatalne dobi. Po prikupljanju svih podataka pristupilo se formiranju originalne baze podataka.

**Rezultati** poglavlje sadrži 89 strana u kome su precizno prikazani svi dobijeni rezultati.

Ovo poglavlje sadrži 41 tabela i 30 grafikona. Detaljno su prikazani svi novi biomarkeri i njihove pojedinačne osobine, njihove vrednosti u prvom (2, 4, 6 sati po prijemu), trećem i sedmom danu u života. Upoređene su vrednosti novih biomarkera u ne-AKI i AKI grupi i uvek su bile statistički visoko značajne. Određene su cut-off vrednosti i vrednosti AUC-ROC za svaki pojedinačno ispitivani biomarker. Rezultati su dobri i zadovoljavajući, a odlični nakon prilagođavanja biomarkera na pridružene varijable kao što su gestacija, porođajna telesna masa bazni deficit (BD) i Apgar skor (AS). Ranije takva merenja biomarkera su za mnogu

novorođenčad upravo bile jednake postnatalnom uzrastu u satima, jer su odmah po rođenju transportovani u Institut za neonatologiju. To su najranije vremenske tačke u kojima su biomarkeri mereni i najranije tačke u kojima je na osnovu njihove vrednosti moguće postaviti dijagnozu AKI, mnogo pre vremena u kome se dijagnoza postavlja konvencionalnim biomarkerima, serumski kreatininom i smanjenom diurezom. Za sve biomarkere je urađena multivarijantna regresiona analiza i prilagođavanje (korekcija), na pridružene varijable: gestaciju, porođajnu telesnu masu i postnatalnu dob, koje su za novorođenčad veoma važne varijable, posebno značajne za bubrežnu funkciju. Svi ispitivani biomarkeri su u funkciji gestacijske i postnatalne dobi, baznog deficita i Apgar skora.

**Diskusija** je poglavlje koje sadrži 28 strana i u kome su analizirani dobijeni rezultati istraživanja uz poređenje sa podacima iz literature.

**Zaključak:** je poglavlje koje prikazuje najvažnije nalaze rada redosledom koji odgovara postavljenim ciljevima.

**Literatura:** je poglavlje koje sadrži 117 bibliografskih jedinica iz relevantnih časopisa pretežno novijeg datuma.

## B) OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Ova prospektivna studija je obuhvatila 108 pretermijske novorođenčadi sa perinatalnom asfiksijom prosečne gestacije ( $33.9 \pm 20$ ) gestacionih nedelja, prosečne porođajne telesne mase ( $2214 \pm 551$ ) grama i prosečnog AS ( $5.00 \pm 1.62$ ). U odnosu na pojavu ili odsustvo bolesti svi ispitanici su podeljeni u dve grupe ne-AKI (32.4%) i AKI (67.6%) grupu. Dalje prema AKIN klasifikaciji, odnosno težini AKI, novorođenčad sa AKI su podeljena u dve podgrupe AKIN1 (83.6%) i AKIN2 (16.4%). U ovom ispitivanju nisu registrovani oblici AKIN3 kao najtežeg oblika. Za bazalnu vrednost serumskog kreatinina, kao polaznu osnovu za dijagnozu, uzeta je vrednost serumskog kreatinina u trećem danu života novorođenčadi imajući u vidu da je u to vreme uticaj kreatinina majke manje izražen. Dijagnoza AKI na osnovu serumskih koncentracija kreatinina je postavljena u trećem danu života, što može, sa terapijskih i prognostičkih aspekata

biti veoma kasno. Ispitivana grupa prevremeno rođene dece je imala umerenu perinatalnu asfiksiju, pa je i procenat registrovanih sa AKI visok. U odnosu na diurezu dominirali su neoligurici pacijenti što ukazuje na nesavršenost diureze kao markera AKI u novorođenadi. Oslanjajući se samo smanjenu diurezu kao marker AKI bili bi u situaciji da mnoge bolesnike ne registrujemo. Prema protokolu studije uzorci krvi i urina za merenje biomarkera propisno su uzeti do analize. Izmerene vrednosti su pokazale rani porast već u prvom danu života (DAN1) u 2,4 i 6 satima prvog dana, što je veoma rano i optimalno vreme za dijagnozu. Analize novih biomarkera (uNGAL, sNGAL i KIM-1) su u klinici kao slepa proba i nisu uticale na klinički tretman novorođenadi.

### **C) UPOREDNA ANALIZA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE**

Rezultati istraživanja doktorske disertacije su sistematizovani u uporedbeni sa rezultatima drugih autora. Istraživanja novih biomarkera su u fokusu naučnih istraživanja u poslednjoj deceniji i broj radova svakodnevno raste, ali broj radova kod novorođenadi, posebno pretermijske je izrazito mali, pa je u tom smislu značaj ovog rada veliki, koji prvi u našoj sredini, a među retkima u svetu pokazuje karakteristike i vrednosti novih biomarkera kod pretermijskog novorođeneta. Po literarnim podacima među ispitivanim biomarkerima najviše obećava NGAL. Misra i saradnici su već davne 2003. i 2005. godine objavili prve radove o NGAL kod dece nakon kardiopulmonalnog bajpasa koji su ukazivali na značaj NGAL i njegove potencijano dobre osobine u ranoj detekciji AKI u dece [Misra i saradnici 2003 (Ped. Neph) i 2005 (Lancet)].

Prethodne studije su pokazale da novorođenad sa nižom gestacijom i porođajnom telesnom masom imaju više nivoa NGAL. U studiji Lavery-a i saradnika urinarni NGAL je meren u 20 pretermijske novorođenadi. Rezultati studije su pokazali da su više vrednosti urinarnog NGAL imala novorođenad sa manjom gestacijom ili novorođenad sa malom telesnom masom za gestaciju. Studija zaključuje da klinička upotreba uNGAL kao biomarkera neonatalnog AKI zaslužuje dalje ispitivanje [Lavery 2008 (Ped Res)]

Mnogi autori su istraživali značaj serumskog NGAL u dijagnozi AKI u novorođenadi. Krawczeski i saradnici su ispitali i serum i urinarni NGAL u 374 dece nakon kardiopulmonalnog bajpasa (CBP) [Krawczeski et al. 2011 (J Ped)]. Samo 35 su bila novorođenad i 5 (14.3%) su razvili AKI. Oni su pronašli da je NGAL predvideo AKI u drugom satu nakon CBP sa AUC u rangu od 0.74-0.88. U studiji Sarafidisa i saradnika koja je uključila

13 asfikti ne novoro en adi i 22 ne asfikti ne novoro en adi osmoro je imalo AKI (Sarafidis i sar 2012g.). Serum NGAL i urin NGAL kao i serum Cystatin C bolje predviđaju perinatalnu asfiksiju nego AKI, tako e su njihove vrednosti bile veće u asfikti ne novoro en adi ak i u onih koji nisu razvili AKI. Ragall i saradnici su ispitivali sNGAL u 30 novoro en adi sa hipoksi kom encefalopatijom od kojih je 13(43.3%) razvilo AKI [Ragall 2013]. Oni su pronašli porast sNGAL merenog tokom šest sati posle ro enja na što pouzdano ukazuje AUC (0.968) za AKI u asfikti ne novoro en adi. Kona no Smertka i saradnici su ispitivali 73 novoro en adi sa sepsom i 29 bez sepse [Smertka et al 2014]. Petoro (6.8%) septi ne novoro en adi je razvilo AKI. Autori su zaklju ili da NGAL preciznije odražava ozbiljnost inflamatornog statusa od AKI, to jest da je NGAL više marker zapaljenja nego AKI. U našem radu pokazano je sli no Ragallu i saradnicima korist od sNGAL u ranoj detekciji AKI u novoro en adi sa perinatalnom asfiksijom. Ni jedan pacijent u ovom ispitivanju nije imao sepsu niti bilo koji drugi dokazani infektivni ili inflamatorni status, te se stoga jasno pove anje vrednosti sNGAL može pripisati samo AKI. U ovom radu je korištena vrednost serumskog kreatinina u tre em danu života (DOL3) za definiciju AKI, imaju i u vidu da u to vreme srumski kreatinin bolje reflektuje bubrežnu funkciju novoro en eta. Najve u snagu ove studije ine veliki uzorak pretermiske novoro en adi (108) i rigorozno poštovanje protokola studije koje je obezbedilo uzorke urina i krvi za najranije merenje biomarkera što je omogulo veoma ranu procenu njihovih osobina, zahvaljuju i kojima je mogua najranija identifikaciju bolesnika sa AKI.

#### **D) OBJAVLJIVANJE ILI SAOPŠTENI REZULTATI KOJI INE DEO TEZE**

Rad u asopisu koji je indexiran u Science citation Index-u (SCI) Expanded

Pejovi B, Eri -Marinkovi J, Pejovi M, Kotur-Stevuljevi J, Peco-Anti A. Detection of acute kidney injury in premature asphyxiated neonates by serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (sNGAL)-sensitivity and specificity of a potential new biomarker. *Biochemia Medica* 2015;25(3):450-9. <http://dx.doi.org/10.11613/BM.2015.046>

#### **E) ZAKLJU AK**

Disertacija dr Biljane Pejovi u potpunosti zadovoljava kriterijume predviđene zakonom i Statutom Medicinskog fakulteta u pogledu naučnog doprinosa doktorske disertacije.

Ciljevi su precizno definisani, metodologija rada je jasno opisana, rezultati pregledno prikazani i izvedeni zaključci su u skladu sa postavljenim ciljevima.

Ova doktorska disertacija Dr Biljane Pejovi je pokazala da su prevremeno rođena deca sa perinatalnom asfiksijom u visokom riziku za razvoj akutnog oštećenja bubrega. Novi biomarkeri omogućavaju ranu dijagnozu akutnog oštećenja bubrega što je važno za primenu odgovarajućih mera lečenja i nege ove dece, a sve u cilju smanjenja visokog stepena morbiditeta i mortaliteta ove jako vulnerabilne pedijatrijske populacije.

Mentor :

---

Prof. dr Amira Peco –Anti

Članovi komisije:

---

Prof.dr Marija Luka

---

Prof.dr Mladenko Vasiljevi

Komentor:

---

N.sav.dr sci Marija Glibeti

---

Prof.dr Jelena Kotur Stevuljevi