

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA

Na sednici Nastavno-naučnog Veća Farmaceutskog fakulteta, održanoj 11.06. 2015. godine, određeni smo u Komisiju za ocenu završene doktorske teze pod nazivom „Dijagnostički i ekonomski značaj određivanja biomarkera akutnog oštećenja bubrega kod dece“ kandidata dipl. farmaceuta-medicinskog biohemičara Stanislave Petrović, te posle pregledane teze podnosimo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A. SADRŽAJ DOKTORSKE TEZE

Doktorska teza je napisana na 112 strana, ima 30 tabela, 18 slika i 174 literaturna navoda. Sadržaj doktorske teze izložen je u sledećim poglavljima: Uvod (33 strane), Ciljevi rada (2 strane), Materijal i metode (18 strana), Rezultati (29 strana), Diskusija (10 strana), Zaključci (2 strane) i Literatura (14 strana).

Ciljevi ove doktorske teze bili su: ispitivanje promene biomarkera bubrežne funkcije - molekula oštećenja bubrega-1 [*kidney injury molecule-1* (KIM-1)] i lipokalina [*neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL)] u urinu (uNGAL) i serumu (sNGAL) u odnosu na stanje inflamacije i razvoj akutnog oštećenja bubrega (AOB) kod dece sa infekcijom urinarnog trakta (IUT); ispitivanje dijagnostičke tačnosti ovih parametara u skriningu razvoja AOB i dužine trajanja inflamacije kod dece sa IUT; utvrđivanje ukupnog prooksidativnog i antioksidativnog kapaciteta dece sa IUT merenjem parametara totalnog oksidativnog statusa (TOS) i totalnog antioksidativnog statusa (TAS) i računanjem indeksa oksidativnog stresa (OSI), kao i njihove promene u skladu sa stanjem akutne inflamacije i razvojem AOB; ekonomska analiza primene različitih AOB biomarkera: uNGAL, jetrenog tip vezujućeg proteina za masne kiseline [*liver-type fatty acid-binding protein* (L-FABP)] u urinu (uL-FAB) i cistatina C [*Cystatin-C* (Cys-C)] u serumu (sCys-C) u odnosu na aktuelnu dijagnostičku metodu (merenje koncentracije kreatinina u serumu) kod dece u kardiohirurgiji.

U poglavlju Materijal i metode u okviru dela o biomarkerima AOB i parametrima oksidativnog statusa kod dece sa IUT dati su podaci o ispitanicima i primenjenim

metodama. Istraživanje je obuhvatilo 50 pacijenata prosečne starosti do dve godine kojima je na prijemu u bolnicu Univerzitetske dečije klinike u Beogradu dijagnostikovana prva febrilna IUT. Deca kod kojih su utvrđene anorektalne i urogenitalne anomalije, ili neurološke bolesti nisu bila uključena u ovu studiju. Studija je sprovedena u skladu sa etičkim načelima Helsinške deklaracije i načelima Etičkog komiteta Univerzitetske dečije klinike u Beogradu i Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Etički komiteti ove dve ustanove dali su saglasnost za sprovođenje studije (broj rešenja: 1169/2 Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i 017/6-26/112 Univerzitetske dečije klinike u Beogradu). U studiju su uključena deca čiji su roditelji ili staratelji dali pismenu saglasnost za učestvovanje u istraživanju.

Za svakog pacijenta sakupljena su po dva uzorka krvi i urina, po prijemu u bolnicu i u vreme otpusta iz bolnice. Krv je svakom pacijentu uzeta u epruvete bez aditiva za biohemijske analize. Uzorci seruma iskorišćeni su za određivanje koncentracije markera inflamacije C reaktivnog proteina (CRP), parametara bubrežne funkcije (ureje i kreatinina), biomarkera AOB (sNGAL), kao i parametara oksidativnog statusa (TAS i TOS). Uzorci urina prikupljeni su tehnikom srednjeg mlaza ili primenom sterilnih kesica. Jedan deo urina korišćen je za hemijsku analizu i mikroskopsko ispitivanje sedimenta urina, određivanje koncentracije biomarkera AOB (uNGAL i KIM-1), a drugi deo za mikrobiološka ispitivanja. Alikvoti seruma i urina čuvani su na -80°C za određivanje biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa, a svi ostali testovi su izvedeni odmah. Koncentracije ureje i kreatinina određene su rutinskim metodama, a koncentracija CRP primenom imunoturbidimetrijske metode. Biomarkeri AOB (sNGAL, uNGAL i KIM-1) određeni su ELISA sendvič metodom. Za određivanje parametara oksidativnog statusa (TAS i TOS) primenjene su nove spektrofotometrijske metode koje je formulisao Erel. Urađena je modifikacija Erel-ove metode i aplikacija na analizatoru ILAB 300 plus. Odnos TOS i TAS izražen je kao OSI.

Klasifikacija pacijenata je sprovedena na dva načina: prema proceni stanja bubrežne funkcije i prema trajanju inflamacije tokom IUT. Procena bubrežne funkcije izvršena je na osnovu izračunate vrednosti brzine glomerularne filtracije [*glomerular filtration rate* (GFR)] primenom Schwartz-ove formule. Podela pacijenata u grupe prema razvoju AOB (sa AOB i bez AOB) vršena je prema smanjenju vrednosti GFR za više od 25% u odnosu na referentne vrednosti za dati uzrast. U drugoj klasifikaciji, pacijenti su podeljeni prema CRP vrednostima dobijenim pri otpustu iz bolnice. Formirane su dve grupe: pacijenti sa koncentracijom CRP većom od 10mg/L pri otpustu iz bolnice su označeni kao pacijenti sa dužim trajanjem inflamacije, dok su pacijenti sa koncentracijom CRP manjom od 10mg/L označeni kao pacijenti sa kraćim trajanjem inflamacije.

Statistička analiza urađena je upotrebom programa Window SPSS, verzija 21 i MedCalc programa za statistički softver Windows Version 9.6.3. (Mariakerke, Belgium).

U okviru dela o ekonomskoj analizi primene biomarkera AOB kod dece u kardiohirurgiji korišćena je analiza odnosa troškova i efektivnosti (TE) strategija koje se baziraju na primeni novih biomarkera (sCys C, uNGAL, uL-FABP) za dijagnostikovanje AOB, a u poređenju sa trenutnom dijagnostičkom strategijom (određivanjem koncentracije kreatinina u serumu). Za analizu TE je primenjeno "drvo odluke" i Markovljev model. "Drvo odluke" je korišćeno za istraživanje svih verovatnih puteva i posledica koji se mogu pojaviti tokom vremena. Markovljev model je primenjen za evaluaciju hroničnih bolesti u kojima se tretmani i zdravstvena stanja ponavljaju. Tranzicione verovatnoće u Markovljevom modelu utvrđene su sistematskim pregledom stručne literature za AOB kod dece posle kardiohirurških intervencija. Kao parametar efektivnosti korišćen je parametar godine života prilagođene u odnosu na kvalitet [*Quality adjusted life-year (QALY)*].

Za ekonomsku analizu korišćen je TreeAge Healthcare module version 1.5.2.

U poglavlju Rezultati najpre su prikazane demografske karakteristike (pol, starost, indeks telesne mase (ITM), telesna temperatura, trajanje povišene telesne temperature, broj dana provedenih u bolnici, uzročnik infekcije i primenjena terapija) kao i koncentracije ispitivanih parametara kreatinina i ureje, broj leukocita i GFR.

Budući da se uzrast dece kretao u rasponu od 1 meseca do 12 godina, inter- i intra-individualna varijabilnost za svaki pojedinačan parametar izračunati su u vreme prijema u bolnicu i u vreme otpusta iz bolnice, posebno u grupama dece mlađe i starije od 12 meseci. Koeficijent varijacije (Kv) između subjekata (interindividualna varijabilnost) za svaki parametar je izračunata u vreme prijema i otpusta iz bolnice. Intraindividualna varijabilnost je izražena kao korelacija između vrednosti za svaki parametar u trenutku prijema u bolnicu i vrednosti istog parametra u vreme otpusta iz bolnice, računanjem Spearman-ovog koeficijenta korelacije.

Potom su računane promene vrednosti biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa u vreme prijema i u vreme otpusta iz bolnice. Za analizu kontinuiranih promenljivih između ispitanika tokom prijema i u vreme otpusta iz bolnice (dve tačke merenja), koje su distribuirane po normalnoj raspodeli, upotrebljen je Student-t test za dva zavisna uzorka.

Nakon toga ispitane su promene vrednosti biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa u odnosu na trajanje inflamacije i razvoj AOB. Efekat trajanja inflamacije (izražen u odnosu na koncentraciju CRP) i razvoj AOB na varijable u serumu i urinu u vreme otpusta iz bolnice ispitani su Student-t testom za dva nezavisna uzorka i analizom kovarijanse (ANCOVA) uz korekciju za bazalne vrednosti (vrednosti u trenutku prijema u bolnicu). Pored toga, promene u ispitivanim varijablama su analizirane

korišćenjem dvofaktorske analize varijanse (ANOVA) sa ponavljanjem, gde su kao faktori korišćeni vreme prijema i otpusta pacijenata iz bolnice i razvoj AOB. Podaci koji nisu distribuirani po normalnoj raspodeli analizirani su primenom neparametarskog Wilcoxon signed-rank testa za dva zavisna uzorka ili Mann-Whitney testa za dva nezavisna uzorka.

Određivana je i dijagnostička tačnost: 1. pojedinačnih biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa za detekciju dužeg trajanja inflamacije; 2. kombinacije biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa sa brojem leukocita za detekciju dužeg trajanja inflamacije, 3. pojedinačnih biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa za detekciju AOB; 4. kombinacije biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa sa urejom za detekciju AOB. Dijagnostička tačnost ispitivanih parametara je proverena upotrebom ROC (*Receiver Operating Characteristic*) analize.

Rezultati ekonomske analize su prikazani kao inkrementalni odnos TE [*incremental cost-effectiveness ratio* (ICER)]. Na ovaj način su metode poređene i postavljeni su prioriteti prema intervencijama koje su relativno jeftine (mali trošak po QALY) i na one relativno skupe (visok trošak po QALY). Pouzdanost dobijenih rezultatata je testirana primenom probablističke analize osetljivosti upotrebom *Monte-Carlo* simulacije, pri čemu je izvršeno 10000 simulacija.

Na kraju rada, dati su Zaključci koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

B. ANALIZA REZULTATA

U okviru dela o biomarkerima AOB i parametrima oksidativnog statusa kod dece sa IUT dati su podaci o ispitanicima, i kao što se moglo pretpostaviti, u većini slučajeva uzročnik IUT je bila *Escherichia coli* (88%, 44 slučaja). Prosečna dužina boravka u bolnici je bila 5,5 dana.

Vrednosti svih biomarkera AOB bile su značajno više u vreme prijema u bolnicu od odgovarajućih vrednosti u vreme otpusta iz bolnice. Pored toga, koncentracije CRP su bile značajno niže tokom otpusta iz bolnice u odnosu na odgovarajuće vrednosti za vreme prijema u bolnicu ($P < 0,001$). Od parametara oksidativnog statusa samo su OSI vrednosti bile značajno niže tokom otpusta iz bolnice u odnosu na odgovarajuće vrednosti tokom prijema u bolnicu ($P = 0,026$).

Analiziranjem efekta trajanja inflamacije koji je izražen u odnosu na koncentraciju CRP, utvrđeno je da su koncentracije uNGAL kod ispitanika sa dužim trajanjem inflamacije bile više (115,37 ng/mL) u odnosu na uNGAL koncentracije

ispitanika sa kraćim trajanjem inflamacije u isto vreme (67,87 ng/mL, P=0,022). sNGAL (P=0,155) i KIM-1 (P=0,198) koncentracije nisu pokazale značajne razlike između ispitivanih grupa. Od parametara oksidativnog statusa u zavisnosti od dužine trajanja inflamacije značajnu promenu su pokazali TAS i OSI. TAS vrednosti su bile značajno više kod pacijenata sa dužim trajanjem inflamacije (0,99 mmol/L \pm 0,40 mmol/L) u odnosu na one kod kojih je inflamacija kraće trajala (0,57 mmol/L \pm 0,37 mmol/L), P=0,017. Shodno tome, OSI vrednosti su bile značajno niže u grupi sa dužim trajanja inflamacije [0,032 AU (0,018-0,042)] nego u grupi sa kraćim trajanjem inflamacije [0,041 AU (0,029-0,053)], P=0,037.

Sposobnost biomarkera AOB za detekciju dužeg trajanja inflamacije ispitivana je analizom ROC krive, pri čemu su analizirane vrednosti biomarkera AOB na prijemu u bolnicu. Vrednosti parametara pri prijemu u bolnicu za KIM-1 (AUC=0,519, P=0,847), uNGAL (AUC=0,549, P=0,638), sNGAL (AUC=0,516, P=0,855), kreatinin (AUC=0,538, P=0,695) i ureju (AUC=0,560, P=0,538) nisu imale sposobnost da detektuju duže trajanje inflamacije, dok je jedino i očekivano broj leukocita na prijemu u bolnicu ispoljio značajnu sposobnost za detekciju dužeg trajanja inflamacije (AUC=0,688, P=0,047). Od parametara oksidativnog statusa, vrednosti TAS (AUC=0,785, P=0,023) i OSI (AUC=0,765, P=0,036) pri prijemu u bolnicu su imale sposobnost da detektuju duže trajanje inflamacije. Dijagnostička tačnost parametara oksidativnog statusa TAS i OSI za detekciju dužeg trajanja inflamacije je čak bila bolja od broja leukocita.

Ispitana je i potencijalna korist od dodavanja biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa broju leukocita u cilju bolje detekcije pacijenata sa dužim trajanjem inflamacije u odnosu na one kod kojih je inflamacija trajala kraće. Dodatak kreatinina (AUC=0,723, P=0,027) i ureje (AUC=0,762, P=0,009) je povećao AUC za broj leukocita, dok je dodatak uNGAL (AUC=0,695, P=0,041) imao marginalni efekat. sNGAL i KIM-1 nisu značajno povećali dijagnostičku tačnost broja leukocita u detekciji dužeg trajanja inflamacije. Kod parametara oksidativnog statusa, nijedan od ispitivanih modela nije pokazao bolju dijagnostičku tačnost od pojedinačnih parametara. Iako su AUC vrednosti bile 0,7 i veće, samo je u slučaju kombinacije broja leukocita i parametra TAS dobijena statistička značajnost (AUC=0,778, P=0,026).

Nakon toga su analizirane promene vrednosti biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa u odnosu na razvoj AOB. Značajna razlika u bazalnim vrednostima od analiziranih biomarkera, između grupa sa i bez AOB utvrđena je jedino za KIM-1 (0,519 ng/mL u poređenju sa 0,287 ng/mL, P=0,038). Takođe, nisu pronađene značajne razlike u bazalnim vrednostima parametara oksidativnog statusa između grupa sa i bez AOB. Sposobnost biomarkera za detekciju AOB ispitana je analizom ROC krive. Iako su utvrđene značajno različite vrednosti za KIM-1 između grupa sa i bez AOB, tokom

prijema pacijenata u bolnicu KIM-1 nije pokazao sposobnost razdvajanja pacijenata sa AOB i bez AOB (AUC=0,620, P=0,175). Sposobnost razdvajanja nisu pokazali ni parametri sNGAL (AUC=0,538, P=0,666) i uNGAL (AUC=0,585, P=0,329). S druge strane, AUC vrednost za ureju je bila viša (AUC=0,681, P=0,040). Budući da nisu pronađene značajne razlike u bazalnim vrednostima parametara oksidativnog statusa između grupa sa i bez AOB, tokom prijema pacijenata u bolnicu parametri TAS, TOS i OSI nisu pokazali sposobnost razdvajanja pacijenata sa AOB i bez AOB.

Pošto je samo ureja imala statistički značajnu dijagnostičku tačnost za detekciju AOB, vrednosti ureje su kombinovane sa vrednostima biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa na prijemu u cilju bolje detekcije pacijenata sa AOB u odnosu na one kod kojih nije došlo do razvoja AOB. Kombinacija KIM-1 sa urejom povećala je sposobnost ureje da detektuje pacijente sa većim rizikom za razvoj AOB (AUC=0,705, P=0,023). Dodatak sNGAL (AUC=0,680, P=0,041) nije povećao dijagnostičku tačnost ureje u detekciji AOB, dok je dodatak uNGAL (AUC=0,715, P=0,015) u najvećoj meri povećao dijagnostičku tačnost ureje. Nijedan od ispitivanih modela kombinacije ureje sa parametrima oksidativnog statusa nije pokazao bolju dijagnostičku tačnost od pojedinačnih parametara.

U okviru dela o ekonomskoj analizi primene biomarkera AOB kod dece u kardiohirurgiji najpre su prikazani rezultati osnovnog modela u kome su upoređeni troškovi i QALY sadašnje dijagnostičke strategije (praćenje koncentracije kreatinina u serumu) sa troškovima i QALY dijagnostičkih strategija zasnovanih na primeni novih biomarkera. Odnosi TE za sve strategije bili su između 1483\$/QALY za kreatinin i 3578\$/QALY za uNGAL. Analizirane dijagnostičke strategije bile su isplative u odnosu na aktuelnu dijagnostičku metodu. Međutim, strategije bazirane na primeni uNGAL i sCysC su imale veće troškove i nižu efikasnost (dominirane) u odnosu na uL-FABP strategiju, zbog čega je značajan ICER samo za uL-FABP. Strategija primene uL-FABP povećava QALY za 1,43 u odnosu na aktuelnu dijagnostičku metodu uz dodatni trošak od 8521,87\$. Iz toga sledi, da je ICER za uL-FABP u poređenju sa serumskim kreatininom 5959,35\$ po jednom dodatnom QALY.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA IZ DOKTORSKOG RADA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Biomarkeri AOB i parametri oksidativnog statusa kod dece sa IUT

Blagovremeno identifikovanje dece sa AOB može biti od ključnog značaja za dalje zbrinjavanje, pogotovu što trenutni laboratorijski i klinički parametri nisu dovoljno pouzdani za detekciju akutnog oštećenja (1). Nekoliko puta uvećana koncentracija kreatinina u serumu i smanjenje klirensa kreatinina su osnovni kriterijumi koji se koriste

za dijagnozu AOB. Međutim, vrednosti serumskog kreatinina variraju u odnosu na starost, pol, mišićnu masu i hidrataciju organizma. Pored toga, promene vrednosti kreatinina u serumu zaostaju u odnosu na stepen oštećenja epitelnih ćelija tubula bubrega (1). S druge strane, ispitivanja na životinjama su pokazala da terapiju koja sprečava ili ublažava AOB treba primeniti veoma rano posle oštećenja, a zasigurno pre nego što koncentracija kreatinina u serumu počne da raste (2). Zato su aktuelna ispitivanja biomarkera koji odražavaju promenu bubrežne funkcije u akutnim stanjima, čime bi bila omogućena brza i pouzdana dijagnoza AOB. Dobar biomarker AOB bi trebalo da bude neinvazivan, da se može odrediti iz pristupačnih uzoraka kao što su krv i urin, merljiv korišćenjem standardizovanih testova sa brzim rezultatima i prihvatljivim troškovima. Takođe, važno je da se njihove vrednosti menjaju samo zbog oštećenja bubrega, a ne zbog infekcije, inflamacije i drugih uzroka. Tokom protekle decenije sprovedena su značajna istraživanja nekoliko biomarkera za ranu dijagnozu AOB, uključujući NGAL i KIM-1 (3). Kako bi se obezbedila adekvatna klinička primena biomarkera i interpretacija rezultata neophodna je njihova sistematska procena u različitim kliničkim stanjima sa AOB. Osim toga, malo je verovatno da će jedan biomarker dosledno obezbediti dovoljnu preciznost za blagovremenu dijagnozu AOB u svim kliničkim stanjima, tako da se kombinacijom biomarkera mogu formirati paneli za specifične bolesti ili se može povećati preciznost (1).

Sve novije pedijatrijske studije pokazuju da AOB češće nastaje kao posledica druge systemske bolesti ili njenog lečenja, nego usled primarne bolesti bubrega (4). Oksidativni i inflamatorni procesi uzrokuju direktno oštećenje parenhima bubrega tokom AOB (1). Mogući uzrok za razvoj AOB je i teži oblik IUT, kao posledica hipoperfuzije bubrega usled ozbiljne dehidratacije organizma. Renalni ožiljak je najozbiljnija komplikacija IUT, a formiranju ožiljaka posebno su sklona deca uzrasta do dve godine. Aktuelna dijagnostička procedura za praćenje zahvaćenosti bubrega tokom IUT i inflamacije parenhima bubrega je scintigrafija bubrega. Iako je scintigrafija bubrega najpreciznija u otkrivanju korteksnih oštećenja bubrega izazvanih IUT, to je invazivna i skupa dijagnostička tehnika koja nije uvek dostupna.

Od analiziranih biomarkera AOB, vrednosti uNGAL su bile značajno više u vreme prijema u bolnicu od odgovarajućih vrednosti u vreme otpusta iz bolnice, kao i kod pacijenata sa dužim trajanjem inflamacije u odnosu na pacijente sa kraćim trajanjem inflamacije, tako da su rezultati ove studije potvrdili da je uNGAL osetljiv na stanje infekcije. Prema podacima iz literature, uNGAL i njegova normalizovana vrednost uNGAL/kreatinin mogu se koristiti kao osetljivi markeri za rano otkrivanje IUT u odsustvu AOB i hronične bolesti bubrega (HBB) (5). Sa druge strane, iako su vrednosti KIM-1 bile više u trenutku prijema u bolnicu od odgovarajućih vrednosti u vreme otpusta iz bolnice, KIM-1 nije pokazao značajno više vrednosti u grupi sa dužim trajanjem inflamacije u odnosu na grupu sa kraćim trajanjem inflamacije, čime je potvrđena

stabilnost KIM-1 u inflamaciji. Za sada je poznato da je ekspresija KIM-1 povećana u AOB različite etiologije, HBB, nakon transplantacije bubrega, i u slučaju karcinoma bubrega (6).

Pored toga, u ovoj studiji je ispitano da li bi analizirani biomarkeri AOB sami ili u kombinaciji sa tradicionalnim parametrima inflamacije bili uspješni u detekciji dužeg trajanja inflamacije. Pošto je u studiji Stokland i sar. utvrđen visok stepen korelacije između koncentracije CRP u serumu i patoloških nalaza dobijenih primenom scintigrafije bubrega (7), trajanje inflamacije je praćeno određivanjem koncentracije CRP, direktnog kvantitativnog markera reakcije akutne faze i inteziteta inflamacije tokom IUT. Dugotrajno visoke koncentracije CRP ukazuju na prolongirano zapaljenje koje može dovesti do razvoja fibroze i formiranja ožiljaka u bubregu (8). Od analiziranih parametara KIM-1, uNGAL, sNGAL, kreatinina i ureje, samo je broj leukocita imao statistički ali ne i klinički značajnu dijagnostičku sposobnost u detekciji dužeg trajanja inflamacije (AUC=0,688, P=0,047). Takođe, istražena je i potencijalna korist od dodavanja parametara bubrežne funkcije broju leukocita u cilju boljeg razdvajanja pacijenata sa dužim trajanjem inflamacije. Dodatak kreatinina (AUC=0,723, P=0,027) i ureje (AUC=0,762, P=0,009) povećao je dijagnostičku sposobnost za broj leukocita, dok je dodavanje uNGAL imalo marginalni efekat (AUC=0,695, P=0,041). Bazalne vrednosti uNGAL nisu pokazale sposobnost za detekciju dece koja će imati duže trajanje inflamacije u odnosu na decu sa kraćim trajanjem inflamacije. Do sada nisu objavljene studije koje su proučavale uspešnost novih biomarkera AOB u detekciji dužeg trajanja inflamacije.

U ovom istraživanju testirana je i hipoteza da se povećana urinarna ekskrecija KIM-1 kod dece sa IUT odnosi na oštećenje bubrega. Ispitana je mogućnost ovog proteina kao potencijalnog biomarkera za dijagnozu AOB u prisustvu IUT. Rezultati sprovedene studije pokazuju značajnu razliku u izlučivanju KIM-1 urinom među grupama sa AOB i bez AOB, ali bazalne vrednosti KIM-1 u vreme prijema u bolnicu nisu pokazale sposobnost da razdvoje ove dve grupe ispitanika (AUC=0,620, P=0,175). Diskriminaciona sposobnost KIM-1 za AOB bila je manja od tradicionalnog parametra ureje (AUC=0,681, P=0,040), dok je kombinacija KIM-1 sa urejom povećala je sposobnost ureje da detektuje povećan rizik za razvoj AOB (AUC=0,705, P=0,023). Ovo je prva studija u kojoj je KIM-1 razmatran kao biomarker za detekciju AOB kod dece sa IUT. Do sada je KIM-1 uglavnom ispitivan kao biomarker za AOB u drugim kliničkim stanjima. Pedijatrijska studija na 40 dece koja su podvrgnuta kardiohirurškoj intervenciji utvrdila je da je KIM-1 u 12h postoperativno imao AUC vrednost 0,83 za detekciju AOB (9). Sličan rezultat tačnosti KIM-1 za ranu detekciju AOB utvrđenom u ovom istraživanju, dobijen je u studiji koja je obuhvatila 252 dece (prosečne starosti $11,4 \pm 4,8$ godina) sa različitim primarnim dijagnozama. U ovoj studiji, AUC vrednost za KIM-1 u predviđanju AOB je bila 0,61 (95% IP 0,48-0,73) (10). U studiji Du i sar. (10) pacijenti

su bili podeljeni prema pRIFLE (*pediatric Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage Kidney Disease*) sistemu klasifikacije AOB i KIM-1 je ispoljio višu AUC vrednost za predviđanje pRIFLE-I AOB nego za predviđanje pRIFLE-R AOB. Prema ovim rezultatima, KIM-1 može poslužiti kao biomarker AOB u slučaju težih oboljenja.

Pored toga, danas je dobro poznato da oksidativni stres ima važnu ulogu u patogenezi bolesti bubrega. Bubrezi su izuzetno osetljivi na oštećenje izazvano kiseoničnim radikalima, najverovatnije zbog velike količine dugolančanih, polinezasićenih masnih kiselina koje se nalaze u sastavu renalnih lipida (11). IUT izaziva oksidativni stres i dovodi do supresije antioksidantnih enzima (12). Koncentracije različitih oksidanasa i antioksidanasa se mogu meriti odvojeno u serumu, ali su merenja u tom slučaju dugotrajna, zahtevaju intezivno angažovanje laboratorijskog osoblja i primenu komplikovanih tehnika. Shodno tome, razvijene su mnoge metode koje mere ukupni prooksidantni i antioksidanti kapacitet. Pošto je efekat različitih oksidanasa u serumu aditivan, primenom Erel-ove metode može se odrediti ukupan kapacitet svih pojedinačnih oksidanasa u organizmu koji se naziva TOS (13). TAS predstavlja ukupni antioksidativni kapacitet, odnosno nivo svih antioksidanasa u organizmu, a takođe se može meriti Erel-ovom metodom (14). Analiza TOS i TAS u krvi predstavlja neinvazivan i jednostavan način procene oksidativnog statusa organizma.

U ovom istraživanju bazalne vrednosti TAS su bile više kod pacijenata sa dužim trajanjem inflamacije, što je potvrđeno merenjem koncentracije CRP u vreme otpusta iz bolnice. Iako serum sadrži različite antioksidantne molekule, proteini predstavljaju glavnu antioksidantnu komponentu. Slobodne sulfhidrilne grupe proteina su uglavnom odgovorne za njihov antioksidativni efekat. Primenom Erel-ove metode je utvrđeno da ukupni proteini učestvuju sa 52,9% u izmerenim vrednostima TAS u serumu kod zdravih osoba, (14). Sa druge strane, dobro je poznata činjenica da je inflamatorni odgovor praćen promenama u ekspresiji proteina akutne faze (8). Shodno tome, više vrednosti TAS u stanjima produženog trajanja inflamacije nisu iznenađujuće. Osim toga, ispitano je da li dolazi do promena u parametrima oksidativnog statusa u zavisnosti od oštećenja bubrega. Međutim, nije dokazano da su se parametri oksidativnog statusa značajno razlikovali kod dece sa AOB u odnosu na decu bez AOB. Studija Psotova i sar. koja je uključila odrasle osobe sa HBB, a kojima su mereni određeni parametri (TAS, kreatinin, ureja, mokraćna kiselina) pre i posle dijalize, pokazala je da smanjenje TAS vrednosti posle dijalize uglavnom odgovara smanjenju niskomolekularnih supstanci kreatinina, ureje i mokraćne kiseline (15). Značajno smanjenje TAS vrednosti posle dijalize je takođe utvrđeno kod pedijatrijskih pacijenata tokom hemodijalize (16). U ovoj studiji, TAS nije odrazio promene u koncentraciji antioksidativnih supstanci osetljivih na bubrežnu funkciju.

Takođe, neophodno je uzeti u obzir da su mnoge farmakološke eksperimentalne studije ispitivale uticaj primene dodatne terapije (radikalnih sakupljača i vitamina

antioksidanata, anti-inflamatornih lekova, naročito inhibitora ciklooksigenaze, i kombinacije ovih agenasa), pored klasičnih protokola tretmana antibioticima, na sprečavanje formiranja ožiljaka u bubrezima. Tako je npr. studija na deci sa primarnim nefrotskim sindromom pokazala da TAS vrednosti mogu predvideti odgovor na kortikosteroide u vreme postavljanja dijagnoze, a TAS vrednosti posle prestanka primene kortikosteroida mogu predvideti da li će pacijenti imati recidiv ili ne (17). U tom smislu neophodno je sprovođenje novih studija kako bi se ispitao potencijalni značaj TAS, TOS i OSI, kao parametara za selekciju pacijenata koji bi bili kandidati za primenu dodatne terapije pored antibiotika u cilju sprečavanja eventualnih komplikacija tokom IUT.

Ekonomska analiza primene biomarkera AOB kod dece u kardiohirurgiji

Sa ekonomske tačke gledišta, AOB je povezano sa većim utroškom finansijskih sredstava usled dužeg boravka ovih pacijenata u bolnici, ali i većih troškova povezanih sa dugoročnim posledicama. Procena je da su godišnji troškovi zdravstvene zaštite pripisane lečenju AOB, više od 10 milijardi dolara samo u Sjedinjenim Američkim Državama (18). AOB je česta komplikacija i tokom kardiohirurških intervencija u pedijatriji. Poslednjih decenija ulažu se veliki naponi kako bi se dijagnostika AOB unapredila, pri čemu se velike nade polažu u biomarkere AOB. Pored NGAL i KIM-1 u oblasti kardiohirurgije dosta su ispitani Cys-C i L-FABP (3).

Rezultati sprovedene ekonomske studije pokazuju da su analizirane dijagnostičke strategije zasnovane na primeni biomarkera za AOB isplative u odnosu na aktuelnu dijagnostičku metodu. Međutim, strategije bazirane na primeni uNGAL i sCysC su imale veće troškove i nižu efektivnost (dominirane) u odnosu na uL-FABP strategiju. ICER za uL-FABP u poređenju sa serumskim kreatininom je 5959,35\$/QALY, što je znatno niže u odnosu na definisan prag isplativosti od 50000\$/QALY. Stoga, ovi rezultati ukazuju na to da bi upotreba uL-FABP predstavljala ekonomski najpovoljniju strategiju za rano otkrivanje AOB kod dece tokom kardiohirurških intervencija. Viša cena za uL-FABP test u odnosu na serumski kreatinin, pa čak i sCys C i uNGAL testove, je u potpunosti kompenzovana boljim dijagnostičkim karakteristikama (osetljivost i specifičnost) uL-FABP za rano otkrivanje AOB, koje će omogućiti pravovremeno i efikasnije lečenje pacijenata sa AOB. To bi dovelo do znatnog poboljšanja ishoda pacijenata sa AOB i dugoročne uštede finansijskih sredstava u zdravstvu.

Do sada je sprovedeno malo ekonomskih studija koje su ispitivale isplativost primene novih biomarkera u cilju unapređenja dijagnostike AOB. U studiji Shaw i sar. (19) primenjena je analiza TE za poređenje strategije primene uNGAL u odnosu na određivanje kreatinina kod osobe muškog pola starosti 67 koja podleže kardiohirurškoj intervenciji. Prema rezultatima ove studije, primena uNGAL se pokazala kao troškovno isplativa, a razlika između troškova i QALY se uvećavala kako su se efekti tretmana povećavali. Razlika između ove i studije Shaw i sar. (19) je u studijskoj populaciji i

ispitivanim biomarkerima. Kod dece koja se podvrgavaju kardiohirurškim intervencijama proučavanje biomarkera AOB je neopterećeno uticajem komorbiditeta koji inače otežavaju slične studije kod odraslih, kao što su dijabetes, hronična hipertenzija i ateroskleroza.

Rezultati ove studije ističu značaj efikasnih dijagnostičkih testova, kojim bi se precizno razdvajali pacijenti sa AOB kod kojih bi rana intervencija ili modifikacija terapije ublažila teško i trajno oštećenje bubrega, za razliku od pacijenata koji ne bi imali korist od primene terapije. Jasno je da rana dijagnostika AOB zahteva dobar i povoljan skrining test sa visokom osetljivošću i malim procentom lažno negativnih rezultata, jer je važno da se ne propusti ni jedna obolela osoba (20). Pored toga, važno je da primenjena analiza obezbeđuje brze i tačne rezultate. U tom kontekstu, za razliku od NGAL i Cys C biomarkera za koje su već razvijeni brzi [*point-of-care* (POC)] testovi, L-FABP biomarker još nema mogućnost ove vrste analize. Razvoj POC testa za uL-FABP je poželjno, jer ovi testovi imaju nekoliko prednosti. Osnovna prednost POC testova je njihova sposobnost da omoguće brze rezultate i na taj način obezbede raniji tretman (21). Ostale prednosti uključuju to što se uzorak ne mora posebno pripremati za analizu i manje količine uzorka potrebnih za testiranje, što može biti posebno korisno u pedijatriji.

Literatura:

1. Basu RK, Wheeler D. Approaches to the Management of Acute Kidney Injury in Children. *Recent Patents on Biomarkers* 2011;1:49-59.
2. Hewitt SM, Dear J, Star RA. Discovery of protein biomarkers for renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1677-89.
3. Han WK, Bonventre JV. Biologic markers for the early detection of acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care* 2004;10:476-82.
4. Hui-Stickle S, Brewer ED, Goldstein SL. Pediatric ARF epidemiology at a tertiary care center from 1999 to 2001. *Am J Kidney Dis* 2005;45:96-101.
5. Yilmaz A, Sevketoglu E, Gedikbasi A, et al. Early prediction of urinary tract infection with urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Pediatr Nephrol* 2009; 24:2387-92.
6. Fontanilla J, Han WK. Kidney injury molecule-1 as an early detection tool for acute kidney injury and other renal diseases. *Expert Opin Med Diagn* 2011;5:161-73.
7. Stokland E, Hellstrom M, Jacobsson B, Jodal U, Lundgren P, Sixt R. Early ^{99m}Tc dimercaptosuccinic acid (DMSA) scintigraphy in symptomatic first-time urinary tract infection. *Acta Paediatr* 1996;85:430-6.
8. Andersson L, Preda I, Hahn-Zoric M, et al. Urinary proteins in children with urinary tract infection. *Pediatr Nephrol* 2009;24:1533-8.

9. Han WK, Waikar SS, Johnson A, et al. Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney Int* 2008;73:863–9.
10. Du Y, Zappitelli M, Mian A, et al. Urinary biomarkers to detect acute kidney injury in the pediatric emergency center. *Pediatr Nephrol* 2011;26:267–74.
11. Ozbek E. Induction of Oxidative Stress in Kidney. *Int J Nephrol* 2012;2012:465897.
12. Kurutas EB, Ciragil P, Gul M, Kilinc M. The Effects of Oxidative Stress in Urinary Tract Infection. *Mediators of Inflammation* 2005;4:242–4.
13. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38:1103–11.
14. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004;37:277–85.
15. Psotová J, Zahálková J, Hrbáč J, Šimánek V, Bartek J. Determination of TAC in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports. *Biomed Papers* 2001;145:81–3.
16. Hamed E, El-Abaseri T, Mohamed A, Ahmed A, El-Metwally T. Hypoxia and oxidative stress markers in pediatric patients undergoing hemodialysis: cross section study. *BMC Nephrology* 2012;13:136.
17. Bakr A, Hassan SA, Shoker M, Zaki M, Hassan R. Oxidant stress in primary nephrotic syndrome: does it modulate the response to corticosteroids? *Pediatr Nephrol* 2009;24:2375–80.
18. Chertow GM, Burdick E, Honour M, et al. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3365-70.
19. Shaw AD, Chalfin DB, Kleintjens J. The Economic Impact and Cost-Effectiveness of Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin After Cardiac Surgery. *Clin Ther* 2011;33:1713–25.
20. Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 1998;240:1285.
21. Parikh CR. A point-of-care device for acute kidney injury: a fantastic, futuristic, or frivolous “measure”? *Kidney Int* 2009;76:8-10.

D. OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE TEZE

Dobijeni rezultati su značajni za procenu dužine trajanja inflamacije i razvoja AOB kod dece tokom IUT. Najpre je dobijen uvid u stabilnost KIM-1 u stanjima aktuelne infekcije, što do sada nije ispitano. Dokazano je da je KIM-1 manje osetljiv na stanje inflamacije od NGAL i samim tim više specifičan za ishemijsko oštećenje bubrega. Shodno tome, detekcija povećane urinarne ekskrecije KIM-1 kod dece sa IUT bi ukazivala na oštećenje bubrega. Pošto se za analizu KIM-1 kao uzorak koristi urin umesto krvi, što je posebno korisno u pedijatriji, a pored toga aktuelan je razvoj brzih

skrining urin traka, KIM-1 bi mogao da se koristiti kao biomarker za AOB u pedijatrijskoj populaciji sa IUT. S druge strane, uNGAL se koristiti kao osetljiv marker za rano otkrivanje IUT u odsustvu AOB. Međutim, dokazano je da se bazalne vrednosti uNGAL ne mogu koristiti za procenu dužeg trajanja inflamacije u cilju prognoze ishoda bolesti. Takođe su ispitane i promene u oksidativno-antioksidativnom balansu određivanjem parametara TAS, TOS i OSI kod dece sa IUT. Po prvi put je ispitano da li su ovi parametri osetljivi na prateće inflamatorno stanje tokom IUT, ali isto tako ispitana je i njihova osetljivost na akutne promene u funkciji bubrega. Potencijalni značaj parametara TAS, TOS i OSI se ogleda u selekciji pacijenata za primenu dodatne terapije (antioksidanasa, antiinflamatornih lekova) pored antibiotika, u cilju sprečavanja eventualnih komplikacija tokom IUT.

Pošto neselektivna upotreba različitih biomarkera može udaljiti lekare od adekvatne kliničke procene, ali i neefikasno trošiti značajne svote novca, preporučuje se primena analize TE za procenu novih dijagnostičkih i terapijskih intervencija u cilju efikasnije preraspodele finansijskih sredstava u zdravstvu. S tim ciljem, u ekonomskoj studiji akcenat je stavljen na strategiju ispravno postavljene dijagnoze AOB različitim dijagnostičkim procedurama sa najmanjim utroškom finansijskih sredstava. U ovoj studiji je preporučen efikasan, bezbedan i ekonomičan dijagnostički pristup pedijatrijskim pacijentima sa AOB nakon kardiohirurških intervencija kako bi se smanjio broj smrtnih ishoda i hroničnih komplikacija, a sa druge strane uštedela znatna finansijska sredstva.

E. Objavljeni rezultati koji čine sastavni deo doktorske teze

Radovi u međunarodnim naučnim časopisima

1. **Petrovic S**, Bogavac-Stanojevic N, Peco-Antic A, Ivanisevic I, Kotur-Stevuljevic J, Paripovic D, Sopic M, Jelic-Ivanovic Z. Clinical application neutrophil gelatinase-associated lipocalin and kidney injury molecule-1 as indicators of inflammation persistence and acute kidney injury in children with urinary tract infection. BioMed Research International <http://dx.doi.org/10.1155/2013/947157> (M22)
2. **Petrovic S**, Bogavac-Stanojevic N, Kotur-Stevuljevic J, Peco-Antic A, Ivanisevic I, Ivanisevic J, Paripovic D, Jelic-Ivanovic Z. Oxidative status parameters in children with urinary tract infection. Biochemia Medica 2014;24(2):266–72. (M21)
3. **Petrovic S**, Bogavac-Stanojevic N, Lakic D, Peco-Antic A, Vulicevic I, Ivanisevic I, Kotur-Stevuljevic J, Jelic-Ivanovic Z. Cost-effectiveness analysis of acute kidney biomarkers in pediatric cardiac surgery. Biochemia Medica 2015;25(2):262–71. (M21)

Rad saopšten u izvodu na međunarodnim naučnim skupovima

1. Bogavac-Stanojevic N, **Petrovic S**, Lakic D, Peco-Antic A, Vulicevic I, Ivanisevic I, Kotur-Stevuljevic J, Jelic-Ivanovic Z. Cost-Effectiveness Analysis of the new biomarkers for diagnosis of acute kidney injury in children after cardiac surgery (Meeting Abstract). Value in health 2014;17:A510-A511.

F. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Na osnovu svega što je izloženo u doktorkoj tezi smatramo da ovaj rad predstavlja značajan naučni doprinos za oblast medicinske biohemije. Rezultati iz ove doktorske teze publikovani su u tri naučna rada u časopisima međunarodnog značaja (dva rada u časopisu M21 i jedan rad M22). Stoga predlažemo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati ovaj izveštaj i odobri kandidatu Stanislavi Petrović javnu odbranu doktorske teze pod nazivom „**Dijagnostički i ekonomski značaj određivanja biomarkera akutnog oštećenja bubrega kod dece**“.

Beograd, 05.08.2015.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

dr Nataša Bogavac-Stanojević, vanredni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

dr Jelena Kotur-Stevuljević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

dr Amira Peco-Antić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet