

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Biljana D. Pejović

**RANO OTKRIVANJE AKUTNOG
OŠTEĆENJA BUBREGA KOD
PRETERMINSKOG NOVOROĐENČETA
POMOĆU URINARNIH BIOMARKERA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

BILJANA D. PEJOVIĆ

**EARLY DETECTION AKUTE KIDNEY
INJURY IN THE PREMATURE
NEONATES WITH URINARY
BIOMARKERS**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2016

MENTOR: Prof. dr Amira Peco-Antić, pedijatar-nefrolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u penziji

KOMENTOR: Dr sci Marija Glibetić, molekularni biolog, naučni savetnik u Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **Prof. dr Marija Lukač**, neonatalni hirurg, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. **Prof. dr Mladenko Vasiljević**, ginekolog-perinatolog, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. **Prof.dr Jelena Kotur Stevuljević**, vanredni profesor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ZAHVALJUJEM

- Prof. dr Amiri Peco-Antić dugujem najveću zahvalnost i veliko poštovanje na dugogodišnjoj saradnji, mentorstvu, nesebičnoj stručnoj pomoći, blagonaklonosti i kompletnoj bezrezervnoj podršci prilikom izbora i izrade teze. Bila mi je čast i zadovoljstvo da od nje učim. Njeno znanje, jednostavnost u rešavanju najtežih problema, sposobnost da sve lako objasni, obogatili su moj profesionalni, usudujem se reći i lični život.
- Prof. dr Jeleni Erić Marinković na dragocenoj pomoći u statističkoj obradi podataka, ogromnoj kreativnosti kojom je obeležila ovaj rad.
- Prof. dr Jeleni Kotur Stevuljević na pomoći u određivanju vrednosti biomarkera, brzini i preciznosti sa kojom je sve izvedeno.
- Medicinskom osoblju Institutu za Neonatologiju u Beogradu, svima koji su učestvovali u izradi ovoga rada.
- Porodici i prijateljima na strpljenju i razumevanju.

Posvećeno: Ivi, Mariji i Milošu

RANO OTKRIVANJE AKUTNOG OŠTEĆENJA BUBREGA KOD PRETERMINSKOG NOVOROĐENČETA POMOĆU URINARNIH BIOMARKERA

Rezime:

Uvod: Akutna oštećenje bubrega (AKI), Acute Kidney Injury, je veliki problem u novorođenčadi, posebno preterminske koji značajno povećava perinatalni morbiditet i mortalitet. Takođe AKI može biti faktor rizika za razvoj hronične bubrežne bolesti. Preterminska novorođenčad sa perinatalnom asfiksijom (PNA) su posebno sklona AKI. Incidenca AKI kod preterminske novorođenčadi kreće se od 30% do 70%. Dosadašnja dijagnoza AKI bazira se na porastu vrednostima serumskog kreatinina i smanjenju diureze. Poznato je da su oba, serumski kreatinin i oligurija/anurija kasni markeri smanjene funkcije bubrega i samim tim ne detektuju rano oštećenje bubrega. Stoga dijagnoza AKI obično kasni i ograničava potencijal za rane terapijske intervencije. Očekuje se da će rano otkrivanje AKI poboljšati ishod u jedinicama neonatalne intenzivne nege (NICU). U poslednjoj deceniji su učinjeni značajni napor da se pronađe više pouzdanih ranih biomarkera AKI. Kandidati za nove biomarkere: neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), molekul 1 bubrežnog oštećenja (KIM-1), cistatin C (Cys C), jetreni tip vezujućeg proteina za masne kiseline (L-FABP), interleukin - 6 (IL-6), interleukin -18 (IL-18), hepatocitni faktor rasta (HGF), fibroblastni faktor rasta - 23 (FGF-23), vaskularni endotelijalni faktor rasta α (VEGF), beta - 2 microglobulin (β -2M), alfa -1mikroglobulin (α -1M) i osteopontin (OPN) su ispitivani u poslednje vreme. Čini se da od svih novih biomarkera najviše obećava NGAL. Međutim postoji samo nekoliko studija o NGAL kod novorođenčadi, a veoma mali broj kod preterminske novorođenčadi sa perinatalnom asfiksijom.

Cilj istraživanja: Ispitati AKI u preterminske novorođenčadi i nove biomarkere: urinarni NGAL (uNGAL), serumski NGAL (sNGAL), KIM-1, α -1M, β -2M kao markere AKI u asfiktične preterminske novorođenčadi.

Materijal i metode: Prospektivna studija izvedena u Institutu za neonatologiju u Beogradu uključila je 108 preterminske novorođenčadi sa perinatalnom asfiksijom i AKI. Perinatalna asfiksija je definisana kao Apgar skor (AS) ≤ 7 u 5 minuti života ili pH ≤ 7.20 na prijemu u NICU. AKI je definisan kao porast serum kreatinina za

26.5 μ mol/L ili 50% od osnovne vrednosti u trećem danu života (DAN3) i bio je svrstan po AKIN klasifikaciji u stadijum 1 (AKIN1) u koji su uključeni pacijenti sa porastom sCr od 1.5-1.9 puta od bazalne vrednosti ili sa porastom \geq 26.52 μ mol/L, stadijum 2 (AKIN2) su bili uključeni pacijenti sa sa sCr 2.0-2.9 puta od osnovne vrednosti i na kraju stadijum 3 (AKIN3) sa porastom sCr 3 puta ili više. Svim ispitanicima su mereni biomarkeri: uNGAL, sNGAL, KIM-1, α -1M, β -2M, u protokolom studije određenim vremenskim tačkama.

Rezultati: 108 novorođenčadi gestacijske zrelosti 33.9 ± 2.0 nedelja i AS 5.0 ± 1.62 i bazni deficit (BD) 8.57 ± 3.09 mmol/L su uključeni u ovu prospektivnu studiju. AKI je dijagnostikovano u 67.6% pacijenata. Od ovih pacijenata 83.6% je pripadalo AKIN1 grupi a 16.4% AKIN2. Vrednosti ispitivanih biomarkera bile su značajno veće u AKI nego u ne-AKI grupi. AUC-ROC u prvom danu života za ispitivane biomomarkere iznosio je za: sNGAL u drugom i četvrtom satu (0.72; $p < 0.001$ i 0.85; $p < 0.0001$); za uNGAL u četvrtom satu (0.72; $p < 0.001$), kao i za KIM1 u četvrtom satu (0.70; $p < 0.001$). Ove vrednosti su pokazale veoma dobre prediktivne sposobnosti za AKI.

Zaključak: AKI je česta pojava u prevremeno rođene dece sa APN. Serumski kreatinin i diureza nisu dovoljno pouzdani da rano predvide AKI u preterminske novorođenčadi sa APN. Novi biomarkeri ispitani u našoj studiji uNGAL, sNGAL, KIM-1, mogu biti rani marker AKI u preterminske novorođenčadi sa APN.

Ključne reči:

Novorođenče, preterminsko novorođenče, perinatalna asfiksija, akutna bubrežna insuficijencija, biomarkeri, kreatinin, NGAL

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: pedijatrija/neonatologija

Abstract:

**EARLY DETECTION ACUTE KIDNEY INJURY IN PREMATURE
NEWBORNS BY USING URINARY BIOMARCERS**

Introduction: Acute kidney injury (AKI) is a major problem in neonates, especially in premature infants, that significantly increases perinatal morbidity and mortality. It may also be a risk factor for chronic kidney disease development. Preterm neonates with perinatal asphyxia (PNA) are particularly prone to AKI. The published incidence of AKI in neonates with moderate to severe perinatal asphyxia ranges from 30% to 70%. The current diagnosis of AKI is based on serum creatinine increase and urine output decrease. It is well known that both of them are late markers of reduced kidney function and, therefore, do not detect early kidney damage. Therefore, AKI diagnosis is usually late, and that limits the potential for early therapeutic intervention. It is expected that early diagnosis of AKI would improve outcome in neonatal intensive care unit. In the last decade considerable efforts have been made to find more reliable early biomarkers of AKI. Many candidates for new biomarkers, including: neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule -1 (KIM-1), cystatin C (Cys C), liver fatty acid binding protein (L-FABP), interleukin - 6 (IL-6), interleukin -18 (IL-18), hepatocyte growth factor (HGF), fibroblast growth factor -23 (FGF-23), vascular endothelial growth factor (VEGF), alpha -1 microglobulin (α -1M), beta - 2 microglobulin (β -2M) and osteopontin (OPN) have been recently tested. NGAL seems to be the most promising of these new biomarkers. However, there only a few studies on urinary NGAL (uNGAL) focused on neonates, and only a limited number of premature infants with perinatal asphyxia have been evaluated.

Aim: The examine acute kidney injury (AKI) in the premature neonates, and new biomarkers as a marker of AKI in asphyxiated preterm infant.

Methods and materials: A prospective study was carried out at the Institute for neonatology Belgrade, and included 108 preterm infants with PNA and AKI. Perinatal asphyxia was defined as an Apgar score $AS \leq 7$ in the 5th minute of life or $pH \leq 7.20$ on admission the NICU. AKI was defined as an increase in serum creatinine

(sCr) \geq 0.3mg/dl(26.5 μ mol/L) or \geq 50% from baseline in the third day of life (DOL3), and was classified by Acute Kidney Injury Network (AKIN) classification; stage 1 (AKIN1) included patients with sCr 1.5-1.9 times baseline on increase \geq 26.52 μ mol/L, stage 2 (AKIN2) included patients with sCr 2.0-2.9 times baseline, and finally, stage 3 (AKIN3) included patients with sCr \geq 3x times baseline. All subjects were measured biomarkers: uNGAL, sNGAL, KIM-1, α -1M, β -2M, in the study protocol specified time points.

Results: 108 neonates of gestational age 33.9 \pm 2.0 weeks and AS 5.0 \pm 1.62 and BD 8.57 \pm 3.09 mmol/L were enrolled in this prospective study. AKI was diagnosed in 67.6% patients. Of these patients, 83.6% belonged to AKIN1 and 16.4% to AKIN2. UNGAL was significantly higher in AKI than in non-AKI group and in AKIN2 than in AKIN1 group. AUC-ROC for uNGAL was very good (DOL₁₄=0.72; p<0.001) on DOL1 at the 4th hour after admission. AUC-ROC for sNGAL on [(DOL₁₂=0.72; p=0.000) and on DOL₁₄=0.85; p=0.000)], AUC-ROC for KIM-1 on (DOL₁₄=0.70; p=0.001).

Conclusion: AKI is common in preterm infants with PNA. Serum creatinine and urine output are not reliable enough to predict AKI in a preterm neonates with PNA. New biomarkers examined in our study: uNGAL, sNGAL, KIM-1 can be early markers of AKI in premature neonates with PNA.

Key words: Newborn, premature newborn, perinatal asphyxia, acute kidney injury, biomarkers, creatinine, neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL), receiver operating characteristics (ROC)

Science Field: medicine

Special topics: pediatrics / neonatology

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Opšti deo	1
1.2. Akutno oštećenje bubrega novorođenčeta.....	3
1.2.1 Istorijat, incidenca i etiologija.....	8
1.2.2. Definicija.....	9
1.2.3. Konvencionalni biomarkeri.....	10
1.2.3.1. Serum kreatinin	10
1.2.3.2. Diureza.....	13
1.2.3.3. Ispitivanje novih biomarkera.....	13
1.2.4. Novi biomarkeri.....	19
1.2.4.1. Neutrofilni želatinozni lipokalin (NGAL).....	19
1.2.4.2.Molekul-1bubrežnog oštećenja (KIM-1).....	25
1.2.4.3. Cistatin C (Cys-C).....	28
1.2.4.4. Liver-type fatty acid-binding protein (L-FABP).....	33
1.2.4.5. Epidermalni faktor rasta(EGF).....	34
1.2.4.6. Fibroblastni faktor rasta (FGF23).....	34
1.2.4.7. N acetyl β glucosamidase (NAG).....	35
2.CILJEVI RADA.....	36

3. METOD RADA.....	37
3.1. Ispitanici.....	37
3.1.1 Kriterijum za uključivanje u studiju.....	38
3.1.2 Kriterijum za isključivanje iz studije.....	38
3.2. Varijable istraživanja i metode merenja.....	38
3.2.1. Varijable istraživanja.....	38
3.2.1.1 Instrumenti istraživanja.....	39
3.2.1.2 Metode merenja kreatinina i ranih biomarkera.....	39
3.2.1.3 Merenje novih biomarkera.....	40
3.2.1.4 Metode odabira i klasifikacija novorođenčadi	41
3.2.1.5 Laboratorijske analize.....	42
3.2.1.6 Metodologija određivanja biomarkera.....	44
3.2.1.7 Radiološka-radioizotopska ispitivanja.....	46
3.3 Statistička analiza.....	46
4. REZULTATI	49
4.1 Analiza rezultata ispitivanja pojave AKI u preterminske novorođ. sa PNA ...	51
4.1.1.1 Vrednosti novih biomarkera (sNGAL, uNGAL, KIM-1 i CysC).....	52
4.1.1.2 Serumski NGAL (sNGAL).....	52
4.1.1.3 Urinarni NGAL (uNGAL).....	61
4.1.1.4 Odnosi urin (uNGAL) /serum (sNGAL)	76
4.1.1.5 Moleku-l bubrežnog oštećenja (KIM-1)	85
4.1.1.6 Alfa-1 mikroglobulin (α 1-M)	102
4.1.1.7 Beta-2 mikroglobulin (β 2-M).....	115

5. DISKUSIJA.....130

6. ZAKLJUČAK.....163

7. LITERATURA.....165

1.UVOD

1.1 OPŠTI DEO

Napredak u perinatalnoj i neonatalnoj medicini značajno je poboljšao preživljavanje novorođenčadi, posebno prevremeno rođene, ali je stepen rezidualnog morbiditeta i mortaliteta još uvek izrazito visok. Danas se većina različitih patoloških stanja uzrokovanih perinatalnom asfiksijom naziva Oxygen Radical Diseases of Prematurity (ORDP). Jedno od najčešćih stanja iz ove kategorije je akutno oštećenje bubrega (AKI) novorođenčeta. Samo po sebi AKI može biti uzročnik teškog perinatalnog i adultnog morbiditeta i mortaliteta, kao što su arterijska hipertenzija i hronična bubrežna insuficijencija. AKI ranije nazivano akutna bubrežna insuficijencija (AKI), predstavlja veliki problem u kliničkoj medicini posebno u odeljenjima neonatalne intenzivne nege (NICU). AKI je kompleksan poremećaj za koji trenutno ne postoji prihvaćena definicija. Javlja se u različitim okolnostima sa kliničkim manifestacijama u rangu od minimalnog porasta serumskog kreatinina (sCr) do anurične akutne bubrežne insuficijencije. U svakodnevnoj kliničkoj praksi isti problem se terminološki različito formuliše kao: akutna renalna insuficijencija, akutna tubularna nekroza, bubrežna disfunkcija, akutna bubrežna insuficijencija. Nedostatak univerzalno prepoznate definicije otežava dijagnostiku, lečenje i studije ovog problema. Osnovna posledica akutnog oštećenja bubrega jeste smanjenje jačine glomerulske filtracije. Najčešće primenjivana klinička merenja u određivanju jačine glomerulske filtracije do sada su se svodila na određivanje vrednosti serumskog kreatinina i praćenje diureze. Ovi pokazatelji su nedovoljni i oba su pod uticajem i drugih faktora osim stepena glomerulske filtracije i kao takvi nepouzdana. Sa druge strane oni ne obezbeđuju nikakvu informaciju o mestu oboljenja bubrega. Bubrežni novorođenčeta je zbog svoje nezrelosti veoma ranjiv i posebno osetljiv na insuficijentnu perfuziju. Neefikasnost mehanizma autoregulacije u novorođenčeta onemogućava mu da brzo kompenzuje promene renalnog arterijskog pritiska. Zato hipovolemija i hipoperfuzija lako uzrokuju njegova oštećenja. Svaka prolongirana nekorrigovana hipoperfuzija neminovno vodi u ishemične promene na ćelijskom nivou i u ozbiljna renalna oštećenja sa značajnim smanjenjem jačine glomerulske filtracije (JGF), azotemijom i vodeno-elektrolitnom deregulacijom. Ovakvi oblici AKI imaju lošu prognozu jer obično odražavaju poremećaj više organa i organskih sistema. Ohrabruju novija saznanja o dobrim ishodima AKI

neoligurijskog tipa. Ova saznanja obavezuju na pravovremenu dijagnozu AKI neoligurične novorođenčadi kao i na brzo, optimalno terapijsko dejstvo. Dosadašnja praksa da se samo prati diureza, bez drugih parametara bubrežne funkcije, može opasno da zavede, i da se propusti identifikacija bolesnika sa neoligurijskim tipom AKI, jer mogućnost da neki bude nedijagnostikovani uvek postoji. Akutnu bubrežnu insuficijenciju ili akutno oštećenje bubrega studije opisuju bazirajući se na promenama u serumskom kreatininu, apsolutnim nivoima serumskog kreatinina, promenama ureje u krvi i urinu, diurezi, ili čak potrebama za dijalizom [1,2,3,4,5,6,7].

U grupu ORDP spadaju mnoga patološka stanja, a najčešća kod novorođenčeta su: akutno oštećenje bubrega (AKI), intraventrikularna hemoragija (IVH), retinopatija prematuriteta (ROP), bronchopulmonalna displazija (BPD), nekrotični enterokolitis (NEC) [8]. Ishemija i hipoksija, fluktuacija oksigenacije i moguća hiperoksija u reperfuziji, uz dodatno često prisutnu infekciju i / ili inflamaciju, uz nizak antioksidativni kapacitet novorođenčeta su faktori rizika za razvoj ORDP [9]. Oksidativni i nitro-oksidativni stres karakteriše poremećaj ravnoteže u stvaranju oksidanata i antioksidativnog sistema, što ima za posledicu ekscesivno oslobađanje reaktivnih kiseoničnih vrsta, (reactive oxygen species - ROS) u ćelijama i ćelijsku degeneraciju [10]. Oslobađeni NO (azot oksid), O_2^- (superoksid anjon radikal), H_2O_2 (vodonik peroksid), i hidroksilni radikal (OH) prisutni u stanjima hiperoksije, reperfuzije i inflamacije u prekomernoj količini, razaraju hemijske veze u ćeliji i tako oštećuju ćelijske lipide, proteine i deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK). Prevremeno rođena deca zbog imaturnog antioksidativnog sistema i autoregulacije su u povećanom riziku od oštećenja oksidativnim stresom [11] a štetni efekti reaktivnih azotnih vrsta na ćelijsku funkciju definišu se kao nitratni stres čija posledica je mikrovaskularna degeneracija. U našem radu ispitali smo AKI jednu od postasfiktivnih komplikacija iz ORDP, koja se može lakše lečiti ako se na vreme otkrije.

1.2. Akutno oštećenje bubrega kod novorođenčeta (AKI)

1.2.1.1 Istorijat

U poslednjih pola veka nefrologija je tavorila u elementarnoj dijagnostici najviše zbog upotrebe konvencionalnih biomarkera za dijagnozu akutnih bubrežnih oštećenja u ranom stadijumu. Dijagnostika AKI pomoću serumskog kreatinina je i dalje kao u pedesetim godinama prošlog veka (1950). Problemi sa kreatininom uočeni su pre trideset godina, uprkos tome što kreatinin ima samo nekoliko karakteristika idealnog biomarkera, ostaje i dalje u širokoj upotrebi kao indikator renalne funkcije i jedini je potvrđen dijagnostički marker AKI po preporuci koju je dao Nacionalni Institut za Dijabetes, Digestivne i Bubrežne bolesti USA (NIDDK). U toku poslednje decenije sprovode se intenzivna ispitivanja biomarkera AKI koji će nadamo se zameniti kreatinin i pomoći u ranijoj i specifičnijoj dijagnozi renalnih bolesti [12]. Poslednjih godina je nastupio veliki procvat u izučavanju brojnih bubrežnih bolesti: dijabetičke nefropatije, renalnih kancera, akutne i hronične bubrežne insuficijencije. Razvoj transplantologije, studije metabolomiksa i proteomiksa u svetlu akutne bubrežne insuficijencije i preeklampsije, ubrzale su razumevanje problema akutnog bubrežnog oštećenja uopšte, a posebno kod dece i novorođenčadi. Rana detekcija oštećenja bubrega kod novorođenčeta postala je imperativ mnogih perinatologa, neonatologa, pedijatarata i nefrologa. Svest o prednosti rane dijagnoze AKI ubrzala je razvoj biomarkera za ranu detekciju bubrežnih bolesti. Poslednja decenija je dovela do eksponencijalnog rasta u istraživanju biomarkera bubrežnih bolesti. Tako su biomarkeri postali najuzbudljivija oblast u istraživanju bubrega [13].

Konačno 2004 godine od strane Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) je objavljena konsenzus definicija AKI koja je dala termin već poznat kao RIFLE. Ubrzo 2007 godine verzija RIFLE kriterijuma je modifikovana i objavljena od strane AKI mreže (AKI-network: AKIN) poznata kao AKIN kriterijum. Ove inicijative podržane su od strane brojnih nacionalnih i internacionalnih udruženja nefrologa i intensivista. Objavljivanjem dogovorene definicije za AKI 2004 godine, koja je dizajnirana da standardizuje i klasifikuje renalnu disfunkciju, učinjen je veliki korak u razumevanju AKI [14]. Ovi precizno definisani kriterijumi mogu detektovati AKI sa visokom senzitivnošću i specifičnošću, opisati različite nivoe težine koji imaju za cilj da predvide prognozu. Definicija i termin RIFLE koristi sledeće kriterijume:

RIFLE sistem klasifikacije obuhvata pet kategorija, tri stepena jačine: rizik za oštećenje (R - *risk of injury*), oštećenje bubrežne funkcije (I - *injury*), slabost bubrežne funkcije (F - *failure*), i dva ishoda: gubitak bubrežne funkcije (L - *loss of function*) i završni stadijum bolesti bubrega (E - *end-stage renal disease*). U RIFLE sistemu klasifikacije kriterijume za AKI čine: koncentracija kreatinina u serumu, JGF i izlučivanje urina (Tabela 1), [15].

Tabela 1. RIFLE sistem klasifikacije za AKI

Kriterijum		
RIFLE kategorija	Koncentracija kreatinina i JGF	Izlučivanje urina
<i>Stepen jačine</i>		
Risk Rizik	↑ Kreatinin $\geq 1.5x$ ili ↓ JGF $\geq 25\%$	<0.5 mL/kg/h tokom 8h
Injury Oštećenje	↑ Kreatinin $\geq 2x$ ili ↓ JGF $\geq 50\%$	<0.5 mL/kg/h tokom 16h
Failure Slabost	↑ Kreatinin $\geq 3x$ ili (Kreatinin) $> 350 \mu\text{mol/L}$ ili ↓ JGF $\geq 75\%$	<0.3 mL/kg/h tokom 24h ili anurija tokom 12h
<i>Ishod</i>		
Loss of function Gubitak bubrežne funkcije	Gubitak bubrežne funkcije >4 nedelje	
End-stage renal disease Završni stadijum bolesti burega	Perzistentan gubitak bubrežne funkcije >3 meseca	

GFR (*glomerular filtration rate*) = JGF (*jačina glomerularne filtracije*)

AKIN sistem klasifikacije takođe definiše AKI prema serumskom kreatininu kao apsolutno i procentualno povećanje serumskog kreatinina ili izlučivanju urina (Tabela 2). U ovom klasifikacionom sistemu unosi se proširenje vremenskog perioda za postavljenje dijagnoze AKI, kao i upotreba termina "insuficijencija" za pacijente kod kojih je neophodno primeniti terapiju zamene bubrežne funkcije [*renal replacement therapies (RRT)*], bez obzira na vrednosti kreatinina ili oliguriju. Prema AKIN kriterijumu, AKI se definiše kao naglo smanjenje bubrežne funkcije, u toku 48h, mereno apsolutnim povećanjem koncentracije kreatinina u serumu za 0.3 mg/dL (26.52 $\mu\text{mol/L}$), procentualnim povećanjem od 50% ili oligurijom (<0.5 mL/kg/h) koja traje duže od 6h. U AKIN sistemu klasifikacije kategorije 1, 2 i 3 zamenjuju tri stepena jačine R, I i F iz RIFLE sistema klasifikacije (Tabela 2), [16].

Tabela 2. AKIN sistem klasifikacije za AKI

Kriterijum		
AKIN kategorija	Koncentracija kreatinina	Izlučivanje urina
<i>Stepen jačine</i>		
AKIN1	$\geq 0.3\text{mg/dL}$ ($26.5\mu\text{mol/L}$) ili $\uparrow 150\text{-}200\%$ ($1.5\text{-}1.99\text{x}$)	$<0.5\text{ mL/kg/h}$ tokom 6h
AKIN2	$\uparrow 200\text{-}300\%$ ($2.0\text{-}2.99\text{x}$)	$<0.5\text{ mL/kg/h}$ tokom 12h
AKIN3	$\uparrow 300\%$ ($\geq 3\text{x}$) ili $>354\mu\text{mol/L}$ sa akutnom epizodom $>44\mu\text{mol/L}$	$<0.3\text{ mL/kg/h}$ tokom 24h ili anurija tokom 12h

RIFLE sistem klasifikacije je kasnije modifikovan za potrebe pedijatrijske populacije *pediatric RIFLE* (pRIFLE), (Tabela 3), [17]. Ovde je kao kriterijum za postavljenje dijagnoze AKI primenjen klirens kreatinina koji se izračunava primenom Schwartz-ove formule [18].

Tabela 3. Modifikacija RIFLE sistema klasifikacije za AKI u pedijatriji (pRIFLE)

Kriterijum		
pRIFLE kategorija	Procenjen klirens kreatinina eCCI	Izlučivanje urina
<i>Stepen jačine</i>		
Risk Rizik	↓ ≥25%	<0.5 mL/kg/h tokom 8h
Injury Oštećenje	↓ ≥50%	<0.5 mL/kg/h tokom 16h
Failure Slabost	↓ ≥75% ili <35 mL/min/1.73m ²	<0.3 mL/kg/h tokom 24h ili anurija tokom 12h
<i>Ishod</i>		
Loss of function Gubitak bubrežne funkcije	Perzistentan gubitak bubrežne funkcije >4 nedelje	
End-stage renal disease Završni stadijum bolesti burega	Perzistentan gubitak bubrežne funkcije >3 meseca	

RIFLE, pRIFLE, AKIN i najnoviji KDIGO sistem klasifikacije AKI, su izuzetno korisni za prospektivna i retrospektivna ispitivanja ali u svakodnevnoj kliničkoj praksi njihova upotreba je ograničena, jer su diureza i kreatinin seruma glavni pokazatelji akutne disfunkcije bubrega. (Tabela 4), [19,20,21,22]. Brojni postojeći problemi u dijagnostici i tretmanu AKI, kao i česta nemogućnost odvajanja fiziologije od patofiziologije bubrega novorođenčeta, nameću neophodnost identifikacije ranog, specifičnog, dovoljno senzitivnog biomarkera koji će omogućiti ranu detekciju bubrežnih oštećenja.

Tabela 4. KDIGO sistem klasifikacije za AKI

Kriterijum		
KDIGO kategorija	Koncentracija kreatinina	Izlučivanje urina
<i>Stepen jačine</i>		
1	$\geq 0.3\text{mg/dL}$ ($26.5\mu\text{mol/L}$) ili \uparrow (1.5-1.9x) od osnovne linije	$<0.5\text{ mL/kg/h}$ tokom 6-12h
2	\uparrow (2.0-2.9x) od osnovne linije	$<0.5\text{ mL/kg/h}$ tokom 12h
3	$\uparrow \geq 4\text{mg/dL}$ ($354\mu\text{mol/L}$) ili početak RRT ili eGFR $<35\text{ml/min/1.73m}^2$ (u pacijenata < 18 godina)	$<0.3\text{ mL/kg/h}$ tokom 24h ili anurija tokom 12h

Mada je potraga za biomarkerima stara koliko i sama medicina, ona je i danas oblast intenzivnih savremenih istraživanja [23]. U novije vreme najveću revoluciju u razvoju biomarkera napravile su studije genoma i proteoma svojim moćnim alatima za njihovo skeniranje. U studijama genoma mikro čestice koje mere kompletan lanac DNK pokrenule su iznalaženje brojnih obećavajućih biomarkera. Korak dalje od genomskih pomerile su se proteomske studije, koje mogu napraviti skrining brojnih peptida i proteina u uzorku krvi ili urina. Personalizovana medicina, vođena zapanjujućim genomskim i proteomskim prednostima, mnogo obećava u našem razumevanju zdravlja i bolesti: preciznije određivanje predispozicija za bolest, dijagnoze i prognoze, ranije preventivne i terapijske intervencije, efikasniji proces razvoja lekova, što sve čini sigurniji i odgovorniji pristup bolesnom čoveku. Biomarkeri su esencijalan alat za implementaciju personalizovane medicine. Unapređivanje personalizovane medicine gura nas sve dalje i dalje u carstvo molekularne medicine da bi otkrili biomarkere sa povećanom specifičnošću i senzitivnošću [24]. "Biomarkeri u bubrežnoj bolesti" je knjiga Čarlsa Edelštajna koja sumira prednosti rane detekcije i ranog pristupa bitnim bolestima bubrega i veliki je napredak u ranoj dijagnozi AKI uopšte a kod novorođenčeta posebno.

Poslednja decenija je dovela do eksponencijalnog rasta u istraživanju biomarkera bubrežnih bolesti i tako su biomarkeri postali najzбудljivija oblast u istraživanju bubrega [25].

1.2.1.2. Incidenca i etiologija AKI

Heterogena etiologija i kompleksnost patofizioloških mehanizama koji su uključeni u razvoj AKI, kao i mnoštvo definicija, značajno otežava utvrđivanje njegove prave incidence. Incidenca AKI varira od 5% hospitalizovanih pacijenata do 30-50% pacijenata na intenzivnoj nezi, a brojni podaci ukazuju da incidenca raste alarmantnom brzinom [26]. Prema podacima pedijatrijskih službi incidenca AKI je uvećana preko devet puta od 1980. do 2004. godine, zbog sve veće upotrebe invazivnih procedura i većeg broja kritično obolele dece [27]. Primenom pRIFLE sistema klasifikacije je utvrđeno da oko 50% kritično obolele dece razvije izvestan stepen oštećenja bubrega tokom boravka u bolnici, a od toga se 82% dijagnostikuje u toku prvih 7 dana [28]. Razvoj AKI tokom boravka pacijenata na intenzivnoj nezi je povezan sa devet puta većom stopom smrtnosti i četiri puta dužim boravkom u bolnici [29]. Pored toga, postoje brojni dokazi da je rizik od hroničnih komplikacija značajno uvećan kod pacijenata sa AKI. Studija Askenazi i saradnika je pokazala da su se kod čak 40-50% pedijatrijskih pacijenata kod kojih je došlo do razvoja AKI ispoljili i znaci hronične bubrežne bolesti (CKD) tokom praćenja u periodu od tri do pet godina, što ukazuje da i manja i umerena oštećenja trajno menjaju bubrežni parenhim [30].

Pored alarmantnih podataka o porastu incidence AKI, sve novije pedijatrijske studije pokazuju da se i etiologija AKI značajno menja. Poslednjih decenija AKI češće nastaje kao posledica druge sistemske bolesti ili njenog lečenja, nego usled primarne bolesti bubrega. Najčešći uzroci AKI u razvijenim zemljama kod dece su komplikacije teških operacija na srcu, transplantacije različitih organa, onkološka terapija, i sepsa a kod novorođenčadi perinatalna asfiksija [1,4,7].

1.2.2. Definicija

U svakodnevnoj kliničkoj praksi isti problem akutnog oštećenja bubrega se terminološki različito formuliše kao: akutna bubrežna insuficijencija, akutna tubulska nekroza, bubrežna disfunkcija. U stručnoj literaturi i praktičnom radu korišćeno je oko 200 različitih definicija. Nedostatak univerzalno prepoznate definicije otežava dijagnostiku, lečenje i studije ovog problema. Tokom 2004 godine sprovedena su istraživanja koja govore da kliničari imaju tendenciju da modifikuju definiciju AKI prema praksi sopstvene institucije [17]. Da bi se uneo red u literaturu o AKI bila je neophodna konsenzusna definicija, koja je objavljena 2004 godine. Uspeh ovih inicijativa je bio veoma brz, jer su naredna istraživanja, pokazala da je broj individualnih definicija AKI pao na manje od 20 različitih definicija [31].

AKI predstavlja iznenadni pad jačine glomerulske filtracije do stepena kada bubreg ne ostvaruje svoju osnovnu ulogu, izlučivanje azotnih materija ureje i kreatinina i očuvanje vodeno-elektrolitne ravnoteže. Definicija AKI u novorođenčeta je teška i manje precizna, zbog brojnih specifičnosti neonatalnog perioda koga karakterišu; bubrežna, metabolička, hormonska, vodeno-elektrolitna adaptacija, nezrelost i maturacija. Serumski kreatinin neposredno po rođenju je odraz majčine renalne funkcije i ima vrednost do 1.0 mg/dL (88.4 μ mol/L). Ova vrednost se tokom vremena postepeno smanjuje. Na AKI kod terminskog ili pre termina rođenog novorođenčeta, uvek treba posumnjati kada vrednost sCr u prvoj nedelji po rođenju ne pada nego na protiv raste. Pri postavljanju dijagnoze AKI novorođenčeta moraju biti uzete u obzir neke kliničke kondicije: porođajna telesna masa, aktuelna telesna masa, način porođaja i prezentacija ploda, neurološki status, gestacijska i postnatalna dob kao i drugi relevantni faktori uključujući; AS, trenutna pH vrednost, bazni deficit (BD) i vrednosti majčinog kreatinina. Većina istraživača smatra da novorođenčad imaju AKI kada je vrednost serum kreatinina 1.5 mg/dL (132.6 μ mol/L) ili veća uz normalnu bubrežnu funkciju majke. U RIFLE sistemu klasifikacije kriterijume za AKI čine: koncentracija kreatinina u serumu, JGF i izlučivanje urina (Tabela 1), [15]. Prema AKIN kriterijumu, AKI se definiše kao naglo smanjenje bubrežne funkcije, u toku 48 sati, mereno apsolutnim povećanjem koncentracije kreatinina u serumu za 0.3 mg/dL (26.52 μ mol/L), ili povećanjem sCr od 50% ili oligurijom (<0.5 mL/kg/h) koja traje duže od 6 sati (Tabela 2), [16]. U pRIFLE definiciji (Tabela 3), [17] kao kriterijum za postavljenje dijagnoze AKI primenjen je klirens kreatinina koji se izračunava primenom Schwartz-ove

formule [18]. Prema KDIGO definiciji AKI predstavlja porast serum kreatinina od osnovne vrednosti, za vrednost ≥ 0.3 mg/dL (≥ 26.52 $\mu\text{mol/L}$), unutar 48 sati ili porast sCr za vrednost ≥ 1.5 mg/dL od bazalne vrednosti unutar 7 dana ili diureza ≤ 0.5 ml/kg/h za 6 sati (Tabela 4), [19-22]. Ovaj porast vrednosti sCr odnosi se na bazičnu vrednost, osnovnu vrednost koju je kod novorođenčeta teško odrediti. Sve savremene definicije: RIFLE, pRIFLE, AKIN i KDIGO uključuju i kriterijum diureze koji za novorođenče nije sasvim pouzdan [32].

1.2.3. Konvencionalni biomarkeri

1.2.3.1. Serumski kreatinin (SCr)

Osnovna posledica akutnog oštećenja bubrega jeste smanjenje jačine glomerulske filtracije (JGF). Najčešće primenjivana klinička merenja u određivanju jačine glomerulske filtracije do sada su se svodila na određivanje vrednosti serumskog kreatinina i praćenje diureze. Ovi pokazatelji su nedovoljni i oba su pod uticajem drugih faktora osim stepena glomerulske filtracije i kao takvi nepouzdan. Sa druge strane oni ne obezbeđuju nikakvu informaciju o mestu oboljenja bubrega. U sadašnjoj kliničkoj praksi AKI, kod novorođenčeta, posebno preterminskog još uvek nije moguće rano dijagnostikovati. Tipično se dijagnostikuje određivanjem koncentracija serumskog kreatinina, koji je na žalost nepouzdan indikator u akutnim fazama bubrežnog oštećenja iz sledećih razloga:

Bazične sCr definicije nisu idealne zbog toga što:

1. SCr je merilo funkcije a ne oštećenja
2. SCr se ne menja sve dok 25-50% bubrežne funkcije je već izgubljeno
3. SCr nivoi široko variraju u odnosu na: mišićnu masu, hidracioni status, pol, uzrast, stanje metabolizma, uticaj endogenih i egzogenih supstanci
4. SCr ne može da razlikuje prerenalnu azotemiju (tranzitornu, reverzibilno smanjenje glomerularne filtracije) od prave povrede bubrega
5. SCr nije specifičan za različite tipove AKI (nefrotoksični, sepsom indukovan, hipoksično-ishemični)
6. SCr se ne može koristiti za procenu bubrežne funkcije dok je bolesnik na dijalizi

7. U prvih nekoliko dana (48 sati) po rođenju, sCr odražava majčinu bubrežnu funkciju, vrednosti sCr zavise od gestacijske i postnatalne dobi
8. Curenje nezrelim kanalima, tubulima, omogućava reapsorpciju kreatinina. U niskim nivoima glomerulske filtracije, količina tubularne sekrecije kreatinina rezultuje precenjivanjem bubrežne funkcije
9. Konačno tokom akutnih promena u glomerulskoj filtraciji nivoi serumskog kreatinina ne opisuju tačno bubrežnu funkciju dok se ne postigne stalan ekvilibrijum, što može zahtevati period od nekoliko dana [3].
10. Interferencija u testovima za određivanje koncentracije kreatinina u serumu može uzrokovati dobijanje pogrešnih rezultata. Najviše korišćena kolorimetrijska metoda za merenje kreatinina Jaffe-ova reakcija detektuje kreatinin kao i nekreatininske hromogene u serumu [3]. U Jaffe-ovoj reakciji kreatinin reaguje direktno sa pikratnim jonom u alkalnim uslovima stvarajući narandžasto obojen kompleks, međutim čak i do 20% obojene reakcije može poticati od drugih supstanci prisutnih u serumu: glukoze, ketona, mokraćne kiseline, hemoglobina, lekova (cefalosporina, furosemida) [3]. Visoke vrednosti bilirubina u serumu mogu uzrokovati lažno niske vrednosti kreatinina [3]. Uvođenjem kinetičke metode sa alkalnim pikratom značajno je redukovana interferencija nekreatininskih hromogena.
11. Pored toga, koncentracija kreatinina u serumu zavisi od brojnih nerenalnih faktora (pol, starost, rasa, mišićna masa, nutritivni status), ne samo od aktuelnog stanja bubrežne funkcije. Produženo intezivno vežbanje, unos kreatinskih suplemenata ili većih količina kuvanog mesa može uzrokovati povećanje serumskog kreatinina u dece i odraslih. Neki lekovi, trimetoprim, cimetidin, salicilati, menjaju tubularnu sekreciju kreatinina što rezultuje izmenama njegove koncentracije u serumu nezavisno od promena JGF. Takođe, bitno je napomenuti da promene u koncentraciji kreatinina u serumu mogu kasniti i par dana u odnosu na aktuelnu promenu JGF. Čak i klirens kreatinina koji se često koristi za procenu bubrežne funkcije ima nedostatak osetljivosti u slučaju blagih i naglih oštećenja, a može biti i pod uticajem tubularne sekrecije kreatinina.

Zbog niza nedostataka kreatinina kao markera za procenu JGF, predloženo je da se koncentracija kreatinina u serumu zameni jednačinom za procenu JGF koja pored vrednosti kreatinina uzima u obzir i antropometrijske podatke kao što su pol, starost,

etnička pripadnost. Tako bi se kompenzovao uticaj mišićne mase na vrednosti kreatinina. I ova procena nije precizna jer i u ovom slučaju postoji problem. Ove jednačine koriste prosečnu mišićnu masu za osobe određene starosti, pola i etničke pripadnosti, zbog toga njihova upotreba ima ograničenja. Zbog ovoga i tendencije za maksimalnom dijagnostičkom tačnošću, proistekla je potreba za formulisanjem više jednačina za različite populacione grupe. Različite formule kao što su Cockcroft-Gault-ova [33] i MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) formula [34] su uvedene za izračunavanje GFR na osnovu koncentracija serumskog kreatinina. Kod dece se za izračunavanje GFR primenjuje Schwartz-ova formula [18]:

$$\text{GFR (mL/min/1,73m}^2\text{)} = k \times \frac{\text{telesna visina (cm)}}{\text{kreatinin } (\mu\text{mol/L)}}$$

Koeficijent k ima vrednost 29.2 za novorođenče; 39.8 za decu uzrasta do 1 godine; 48.6 za decu uzrasta 2-12 godina i za devojčice starije od 12 godina; 61.9 za dečake starije od 13 godina.

1.2.3.2. Ureja, (Blood urea nitrogen-BUN)

Za dijagnozu AKI može poslužiti ureja, blood urea nitrogen (BUN). BUN je takođe suboptimalan marker jer je zavistan od nekih nerenalnih faktora. Ograničavajući faktori su: unos proteina, katabolizam, krvarenja u gornjim partijama gastrointestinalnog trakta (GIT), nutritivni status i terapija visokim dozama kortikosteroida. Promene u BUN i serum kreatininu tokom AKI nisu posebno senzitivne za male promene u JGF. Biomarker oslobođen u krv ili urin iz oštećenog bubrega, analogan je oslobađanju troponina, u oštećenim miokardnim ćelijama nakon ishemije miokarda ili infarkta, može biti senzitivniji ili specifičniji marker AKI nego kreatinin ili BUN. Rana detekcija AKI, sa bubreg-specifičnim biomarkerom, može omogućiti ranije postavljanje dijagnoze bolesti, optimalnije doziranje antibiotika, izbegavanje nefrotoksičnih agenasa i ranije uvođenje specifične terapije za oporavak bubrega. Idealan biomarker AKI bi obezbedio ranu detekciju bubrežnog oštećenja, pre nego što poraste u serumski kreatinin i/ili BUN [35].

1.2.3.3. Diureza - izlučivanje urina

Izlučivanje urina kod novorođenčeta, posebno u prvim satima i danima života je veoma specifično. Diureza kod novorođenčeta je u funkciji gestacijske i postnatalne dobi. Prva mikcija može biti odložena, oskudna ili neregistrovana neposredno po rođenju. Često zavisi od načina porođaja, prezentacije ploda, brzine adaptacije, kondicija novorođenčeta, koji utiču na bubrežnu funkciju. Diureza zavisi od bubrežne funkcije, ali i od ukupnog volumnog statusa organizma, dejstva lekova, pre svega onih sa nefrotoksičnim efektom, kao i diuretika, zatim opstrukcije urotrakta, koncentracije antidiuretskog hormona, insulina. Konačno diureza "zavisi" i od načina merenja urina: kateterizacija mokraćne bešike, kolekcije urina u vrećice, pamučne loptice i pelene deteta. Najprecizniji od svih je kateterizacija mokraćne bešike, iako su svi načini samo orijentacioni, neprecizni, grubi i mogu uzrokovati greške u zaključivanju. U nemogućnosti ultrasonografske vizualizacije urotrakta, takođe, prepuna mokraćna bešika i njeno usporeno pražnjenje mogu stvoriti pogrešnu sliku anurije i/ili oligurije. Zbog toga je diureza nepouzdan, kasni i nedovoljan marker AKI. Bez obzira na ove probleme, značaj diureze je veliki, jer je urin odličan neinvazivno dobijen biološki materijal za analizu, veoma informativan za bubrežnu funkciju, zbog toga se i dalje neke definicije i klasifikacije AKI zasnivaju na diurezi. Kod novorođenčeta kao i kod odraslih AKI može biti neoligurijski i oligurijsko-anurijski, definisano kao diureza od 1 ml/kg/h ili < 0.5 ml/kg/h ili odsustvo diureze u prvih 48 sati života. Tip i stepen renalnog oštećenja diktiraju da li novorođenče ima oligurijski ili neoligurijski AKI. U situacijama normalne diureze AKI može biti nedijagnostikovan ako serumski kreatinin nije izmeren. Zbog svih navedenih razloga diureza nije optimalan biomarker AKI novorođenčeta [32].

1.2.3.4. Ispitivanje novih biomarkera

Potruga za biomarkerima je stara koliko i sama medicina. Najjednostavnija definicija biomarkera kaže da je biomarker ili "biološki marker" bilo koji merljiv pokazatelj biološkog stanja. To znači da je biomarker merljiv, specifičan biološki marker nekog biološkog, fiziološkog ili patološkog procesa ili odgovora na dejstvo lekova. Ovako definisani biomarkeri nalaze široku primenu u biomedicini, kliničkoj farmakologiji, farmaciji i nauci uopšte.

Poslednjih deset godina istraživanje biomarkera bubrežnih bolesti imalo je eksponencijalni rast. Osnivač laboratorije za otkrivanje biomarkera korištenjem spektrometrije proteomiksa i metabolomiksa u Univerzitetu Kolorado Dr Uwe Christijans je napisao značajna poglavlja o biomarkerima u bubrežnim bolestima. Značaj razvoja i definisanja biomarkera bubrežnih bolesti istaknut je od strane Američkog Nacionalnog Instituta za Dijabetes, Digestivne i Bubrežne bolesti (NIDDK). Potreba za ranom dijagnozom bubrežnih bolesti učinila je istraživanje biomarkera jednom od najuzbudljivijih oblasti u ispitivanju bubrega. Savremenu definiciju biomarkera je dala NIDDK grupa za definisanje biomarkera: “Biomarker je karakteristika koja je objektivno izmenjena i procenjena kao indikator normalnog biološkog procesa, patogenog procesa ili farmakološkog odgovora na terapijsku intervenciju”. Biomarker je vrednost holesterola, krvnog pritiska, telesne temperature... Takvi opšti biomarkeri su korišćeni decenijama i vekovima i dalje su ostali moćni alati za praćenje opštih bioloških aktivnosti. Proces razvoja biomarkera tipično je bio postavljen u pet faza.

1. Predklinička ispitivanja (potvrda prioriteta obećavajućih kandidata)
2. Razvoj eseja (razvoj i optimizacija klinički korisnih eseja)
3. Retrospektivna studija [testiranje biomarkera u potpunom kliničkom ogledu, procena specifičnosti i senzitivnosti i određivanje krive, Receiver operating characteristic curve (ROC)], za svaki biomarker
4. Prospektivni skrining (upotreba biomarkera za skrining populacije)
5. Kontrola bolesti (odrediti uticaj skrininga na redukovanje težine bolesti).

U savremenoj medicinskoj praksi teži se iznalaženju najspecifičnijih i najosetljivijih biomarkera kao pokazatelja bolesti i dijagnostičkih sredstava za praćenje lečenja i uspešnosti terapije. Svetske kompanije koje se bave proizvodnjom dijagnostičkih reagenasa, značajno su doprinele otkriću osetljivih biomarkera. Danas se za određivanje pojedinih biohemijskih parametara najčešće primenjuju imunoodređivanja, koja koriste monoklonska antitela i različite vrste obeleživača, čime se postiže visoka specifičnost određivanja. Da bi iz grupe potencijalnih biomarkera bili izabrani oni koji su najznačajniji za kliničku praksu i koji pružaju najviše dijagnostičkih informacija, neophodno je opsežno ispitivanje koje obuhvata utvrđivanje analitičke, kliničke i ekonomske primenljivosti [36]. Primenom statističkih metoda, prvenstveno

ROC analize utvrđuju se prelomne ("cut off") vrednosti, na osnovu kojih se razdvajaju zdravi od obolelih. Odabrani i primenjivi biomarkeri moraju biti isplativi pri kliničkoj primeni, sa stanovišta cene i pružanja najoptimalnijih dijagnostičkih informacija. Dobar biomarker podrazumeva nekoliko osobina:

- pristupačnost (accessibility)
- lako otkrivanje (detectability)
- merljivost (quantifiability)
- validnost (validity)

Biomarker treba da ima jasnu i nedvosmislenu povezanost sa biološkim odgovorom sa kojim se povezuje i određenu stabilnost u tome. Sve ove stroge kriterijume nije lako zadovoljiti, a polje primene biomarkera pod stalnom je lupom i preispitivanjem stručne javnosti. Posebno se ističe merljivost biomarkera i da oni kvantitativno pokazuju stanje nekog biološkog sistema. Očekivan red veličine biomarkera danas je biomolekul različitog porekla, težine, hemijske prirode uključujući : peptide, hormone, oligopeptide, gene ili genske produkte: mRNA, enzimi i drugi proteini, DNK-sekvence, specifične lipidne molekule i razne metabolite.

1.2.3.5. Procena biomarkera

Svaki biomarker se mora podvrgnuti odgovarajućoj proceni odnosno evaluaciji, da bi se utvrdilo da li ispunjava uslove za uspešnu primenu u kliničkoj praksi, da li može potvrditi prisustvo ili odsustvo oboljenja, dobru ili lošu prognozu? Namena biomarkera se mora tačno definisati, kako bi se njegovom primenom dobila odgovarajuća dijagnostička korist. Ova vrsta procena danas se postiže odgovarajućim dizajniranjem proučavanja i dobrom statističkom evaluacijom rezultata [37].

Ispitivanja primene biomarkera obuhvataju najmanje tri faze:

1. U prvoj fazi se procenjuje analitička izvodljivost dijagnostičkog testa. Utvrđuju se analitička preciznost i tačnost, osetljivost i specifičnost metoda, kao i varijacije rezultata dobijenih u kliničkoj primeni u jedne iste osobe a i u različitim osoba.

2. Druga faza predstavlja poređenje rezultata ispitanika, sa oboljenjem i kontrolne grupe, bez oboljenja. Nekada su rezultati u ovoj fazi preterano optimistični, jer se porede odabrani

pacijenti sa poznatim oboljenjem i kontrolni rezultati osoba bez oboljenja. Ako primenjeno određivanje ne pokaže obećavajuće rezultate u ovoj fazi ispitivanja, verovatno neće imati ni dijagnostičku vrednost u kliničkoj praksi.

3. Treća faza obuhvata kliničku primenu odgovarajućeg testa na ciljnoj populaciji na kojoj je planirana primena testa. Ova faza se izvodi kao slepa kontrolisana, prospektivna studija koja treba da da odgovor na specifično kliničko pitanje.

Savremene tehnike: MALDI-TOF: tehnike masivne spektrometrije i SELDI-TOF: površinska spektrometrija, su sposobne da identifikuju veliki broj biomarkera. Urin proteom sadrži 1500 proteina. Urin je manje kompleksan od plazme, odličan je izvor biomarkera produkovanih u bubregu i može dati dobar uvid u specifičnu renalnu funkciju i patologiju. Krvni proteom je veći i sadrži preko 3000 proteina u plazmi. Danas je aktuelan "open-loup", ("otvorena omča") ili nefavorizovani pristup otkrivanju biomarkera [38,39,40]. Studija genetičkog sastava vrste, genomi, stekli su popularnost 1990-tih godina sa početkom Human Genome Projekta, koji je završen 2001 godine. Ljudski genom sadrži 25000 gena, koji su opisani i smešteni u bazama podataka. Prednost mikro-rasporeda ili DNK čipa, dopušta istraživačima da pretražuju hiljade gena uporedo. Takve studije procena genske ekspresije su identifikovale najmanje dva gena, čiji se proteinski produkti pojavljuju kao biomarkeri AKI [41]. Ipak mana metoda baziranih na mikrorasporedu je da one ne mogu da se koriste za direktne analize bioloških fluida. Proteomi su studija i strukturnih i funkcionalnih proteina. Procenjeno je da ljudski proteom sadrži preko 400 000 proteina. Proteini mogu biti proučavani korišćenjem raznih metoda kao što je gel elektroforeza, imuno upijač, imuno-blotting, mass spektrometrija i enzimske i metaboličke analize. Svaki metod se koristi da odredi različite tipove informacija, i ima svoj sopstveni set snage i ograničenja. Napredne tehnologije imaju radikalno poboljšanu brzinu i preciznost u identifikovanju i merenju bioloških fluida tako proteomski pristupi počinju da donose nove urinarne biomarkere u humanim modelima AKI [42].

Biomarkere možemo podeliti i na:

- Dijagnostički biomarkeri (ukazuju na razvoj bolesti ili već razvijenu bolest)
- Prognostički biomarker (ukazuju na prognozu bolesti u zavisnosti od primene tretmana)
- Prediktivni biomarkeri (ukazuju na najverovatnije efekte tretmana)

U farmakologiji biomarkeri se koriste u fazi kliničkog testiranja i proveri efikasnosti novoprimenjenih lekova. Pored ovih kvaliteta klinički relevantan biomarker zahteva i dodatne kvalitete: standardnu pristupačnost, tačnu, jednostavnu i brzu merljivost [43]. Farmakodinamički biomarkeri se koriste u farmaceutskim razvojnim studijama za optimizovanje doze i odlučivanju o daljem razvoju nekog potencijalnog farmaka. Svaki biomarker mora imati dokazanu efikasnost u proceni rizika dijagnostičkoj i prognostičkoj vrednosti. Senzitivnost i specifičnost su osnovni kvaliteti jednog biomarkera koji se mere i očekuju prilikom populacionih analiza [44]. Idealne osobine jednog biomarkera u praksi je teško naći u jednom jedinom biomarkeru i takvih je veoma malo. Najbolji izvor biomarkera su krv i urin. Urin je odličan izvor biomarkera koji se stvaraju u bubregu i daje najbolji uvid u specifičnu renalnu patologiju, manje je kompleksan od seruma i lakši za skrining potencijalnih biomarkera. Prikupljanje urina je jednostavno. Rukovanje urinom utiče na stabilnost biomarkera. Merenje biomarkera u urinu treba uraditi odmah, da bi se izbegla degradacija, ili urin pravilno čuvati zamrznut na -80°C . Nekada se kod urinarnih biomarkera procenjuje odnos: urinarni biomarker / urinarni kreatinin, što zovemo standardizacija i / ili normalizacija, urinarnih biomarkera. Na ovome odnosu urin / kreatinin se baziraju mnoge studije, vodeći računa o razlikama u urin koncentracijama nastalim zbog hidracionog statusa ili dejstva diuretika. S druge strane ovaj odnos urin / kreatinin u mnogim studijama je pod znakom pitanja, zbog varijabilne ekskrecije tokom dana i zavisnosti od normalne bubrežne funkcije. Dobar izvor biomarkera bubrežnih bolesti je krv, serum ili plazma, koji su dostupni čak i kod anuričnih pacijenata. Serum je u prednosti jer je manje sklon bakterijskoj kontaminaciji od urina i smatra se stabilnijim od urina. Serumski biomarkeri s druge strane će verovatno više reprezentovati sistemski nego odgovor pojedinačnog organa na bolest. Realan problem sa serumom kao izvorom biomarkera leži u otkrivanju, jer je koncentracija proteina u serumu veoma velika. Senzitivnost i specifičnost biomarkera idu ruku pod ruku. ROC kriva je binarni klasifikacioni test baziran na senzitivnosti i specifičnosti biomarkera u određenim prelomnim tačkama. ROC krive se često koriste da odrede kliničku dijagnostičku vrednost markera. Area under the curve (AUC), polje ispod krive, je često statistički izvedeno iz ROC krive.

- $\text{AUC} = 0.50$ rezultat koji nije bolji od očekivanog
- $\text{AUC} \geq 0.75$ generalno se smatra dobrim biomarkerom

- AUC = 0.90 je odličan biomarker
- AUC = 1.00 predstavlja savršen biomarker

Biomarkeri su izuzetno korisne i moćne alatke samo u rukama naučnika i kliničara, odgovornih stručnjaka u službi zdravlja. Do sada su otkriveni brojni biomarkeri a oni koji najviše obećavaju su:

1. Neutrofilni želatinozni lipokalin: (NGAL)
2. Cistatin C (Cys-C)
3. Molekul-1 bubrežnog oštećenja: (KIM-1)
4. Jetreni tip vezujućeg proteina za masne kiseline: (L-FABP),
5. Interleukin 18 (IL 18)
6. Urinarni retinol vezujući protein (RBP)
7. Renalni tubularni epitelijalni antigen-1(HRTE-1)
8. N-Acetyl- β glukozaminidaza (NAG)
9. Alanin aminopeptidaza (AAP)
10. Urinarni Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3)
12. α_1 - Mikroglobulin (α_1 - M)
13. β_2 - Mikroglobulin (β_2 - M)
14. Hepatocitni faktor rasta: (HGF)
15. Vaskularni endotelijalni faktor rasta:(VEGF)
16. Osteopontin (OPN)
17. Fibroblastni faktor rasta -23: (FGF23)
18. Epitelijalni faktor rasta : (EGF)

Biomarkeri AKI:

Osnovna uloga ovih biomarkera je da rano dijagnostikuju AKI. Osim toga oni mogu da posluže i u neke druge svrhe:

- za razlikovanje podtipova AKI (prerenalni, renalni, postrenalni)
- za identifikovanje etiologije AKI (ishemija, sepsa, toksini, kombinacije) [41,42]
- za razlikovanje AKI od drugih formi akutnih bubrežnih oboljenja (infekcija urinarnog trakta, glomerulonefritisa, intersticijskog nefritisa)
- za procenu težine AKI [44]
- za praćenje pravca razvoja AKI [44]
- za praćenje odgovora na terapiju

1.2.4. Novi biomarkeri

1.2.4.1. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin - (lipokalin) NGAL

Humani NGAL je jedan od najranije identifikovanih novih biomarkera bubrežnih bolesti. Izolovan je iz sekundarnih granula humanih neutrofila, kao protein od 25-kDa. On je kovalentno vezan za želatinazu iz neutrofila [45]. Protein NGAL je sintetisan u ranom mijelocitnom stadijumu granulopoeze tokom formiranja sekundarnih granula, pa zreli periferni neutrofilni nemaju NGAL-mRNA ekspresiju. Pripada grupi lipokalina, koja čini superfamiliju proteina koji se odlikuju sposobnošću da vezuju male, hidrofobne molekule (vitamine, hormone) u strukturne džepove formirane od β -presavijenih ploča i da grade makromolekulske komplekse [46]. NGAL-mRNA je normalno prisutan u brojnim humanim tkivima odraslih osoba uključujući: koštano srž, uterus, prostatu, pljuvačne žlezde, želudac, kolon, traheju, pluća, jetru i bubreg [47]. Neka od ovih tkiva su izložena dejstvu mikroorganizama i zbog toga sadrže NGAL protein u malim količinama.

NGAL ima nekoliko sinonima:

- neutrofilni lipokalin (NL ili HNL za humanu formu) [48];
- lipokalin 2, onkogen protein 24p33 ili uterokalin kod miševa [49];
- neu-srodni lipokalin [50] ili 25kDa α_2 -mikroglobulinu-srodni protein kod pacova [51].

Humana forma NGAL se sastoji iz jednog polipeptidnog lanca, povezanog disulfidnim mostovima, koji sadrži 178 aminokiselinskih ostataka, molekulske mase oko 22kDa koja se glikozilacijom uvećava na 25kDa [52]. NGAL se lako ekskretuje i detektuje u urinu zbog male molekulske mase i rezistencije na degradaciju, u slobodnoj formi i u kompleksu sa matriks metalo proteinazom-9 (MMP-9). Koncentracije u urinu koreliraju sa plazma koncentracijom, bez obzira na uzrok povećanja NGAL. Izrazito visoke koncentracije u urinu nalaze se kada je NGAL direktno oslobođen u urin od strane bubrežnih tubula ili ćelija karcinoma. Utvrđeno je da se njegova količina povećava u ćelijama koje su pod "stresom" u slučaju: inflamacije, infekcije, ishemije ili neoplastične transformacije [53].

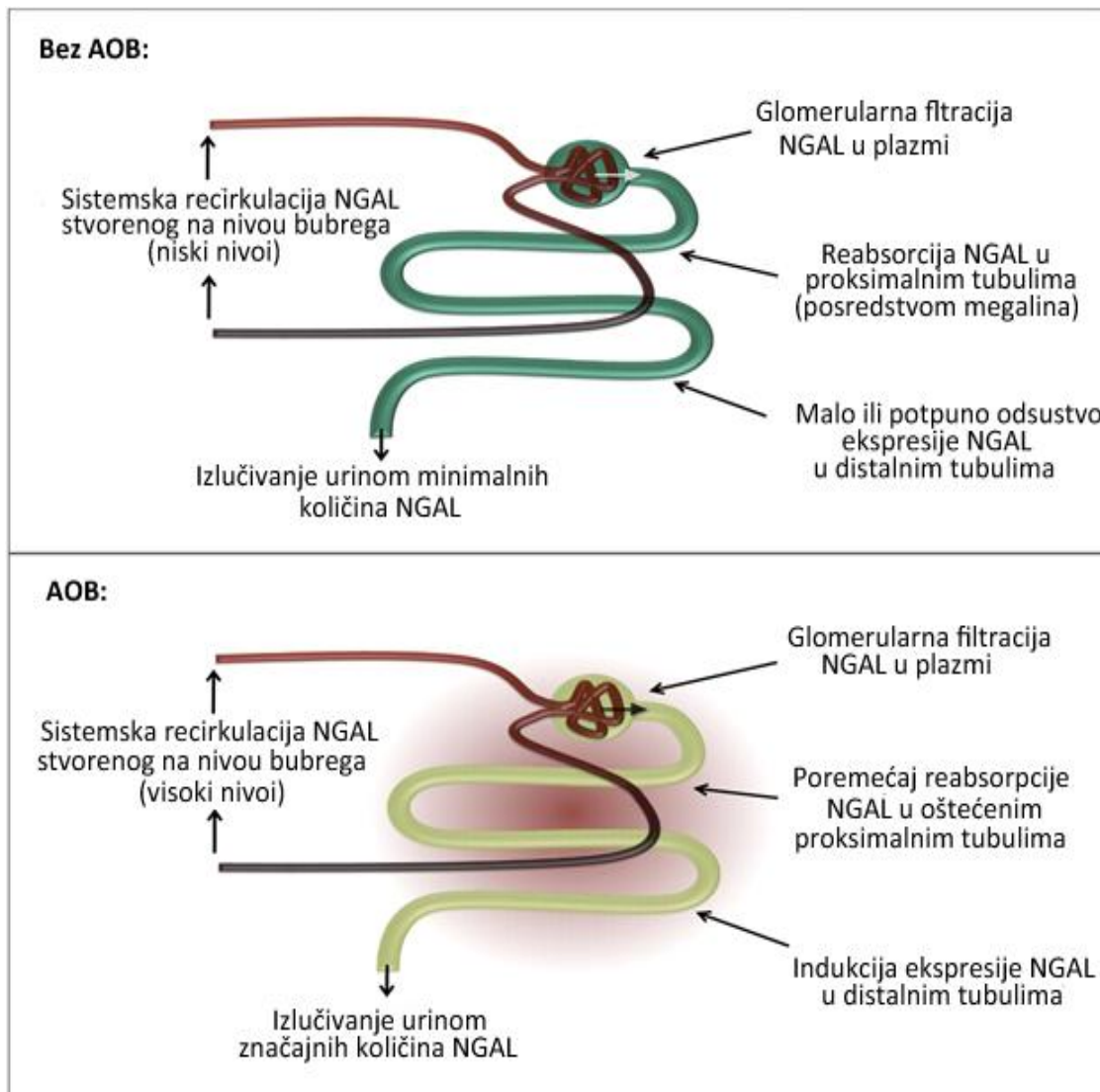
Do sada su otkrivene brojne uloge NGAL. Jedna od njih je u odbrani organizma od bakterijskih infekcija. NGAL je važna komponenta urođenog imunog sistema i odgovoran je za inicijalni imunitet na bakterijske infekcije. Kao komponenta urođenog imunog sistema, NGAL je uključen u nekoliko ćelijskih odgovora: proliferaciju, diferencijaciju ćelija, apoptozu, bakteriostazu [54]. NGAL ispoljava bakteriostatske osobine tako što vezuje enterobaktin, siderofor, oduzimajući Fe^{+3} mikroorganizmima i na taj način inhibira njihov dalji rast i razvoj. U stvari NGAL ima sposobnost heliranja siderofore što ga čini bakteriostatskim agensom. Siderofore su sintetisane od strane bakterija da preuzmu gvožđe iz okoline i koriste specifične transportere da povrate siderofora-gvožđe kompleks, obezbeđujući svoje zalihe gvožđa. Eksperimentalni dokazi za ovu ulogu su izvedeni na animalnim modelima, genetski modifikovanim miševima, koji su imali nedostatak NGAL gena, što ih je činilo osjetljivijim na gram negativne bakterijske infekcije i sepsu [55]. Jedna od važnih uloga NGAL je u transportu gvožđa u organizmu, koji je NGAL posredovan, u čemu učestvuju siderofore, mali molekuli koji vezuju i nose gvožđe [56]. Kao važan faktor proliferacije i diferencijacije ćelija [57], NGAL ima i ulogu faktora rasta i diferencijacije u više tipova ćelija, uključujući bubrežni epitel gde funkcioniše kao anti-apoptični "faktor preživljavanja", štiteći bubrege od akutnog ishemijskog oštećenja. Ova dokazana uloga NGAL se ostvaruje na molekularnom nivou u poboljšavanju epitelijalnog fenotipa, tako NGAL, potstiče epitelijalnu diferencijaciju mezenhimnih progenitora, pospešuje stvaranje glomerula, proksimalnih tubula, Henleove petlje i distalnih tubula i ostvaruje važnu ulogu u rastu i razvoju bubrega [57,14]. Koncentracija NGAL je izrazito povišena u povređenim epitelnim ćelijama, uključujući bubrege, kolon, jetru ili pluća. Ovo je verovatno posredovano preko NF- κ B, za koji je poznato da se brzo aktivira u epitelnim

ćelijama nakon akutnih oštećenja [58] i igra centralnu ulogu u kontrolisanju ćelijskog opstanka i proliferacije [59]. NGAL ima zaštitnu ulogu u očuvanju funkcije zrelog organa kao što je bubreg. Ovaj protektivni efekat se ostvaruje takođe zahvaljujući ulozi NGAL u transportu gvožđa. Toksično gvožđe se helira i iz ekstracelularnog prostora pomoću siderofora i NGAL doprema do intracelularnog prostora, tako se onesposobljava apoptoza i poboljšava proliferativni odgovor [60]. NGAL se povećano luči u brojnim humanim kancerima, gde često predstavlja prediktor loše prognoze [61,62]. Za NGAL-gen je poznato da je indukovano brojn timer-promovišućim agensima uključujući SV 40 i polioma virus, forbol ester (phorbol esters), faktor transformacije neutrofila, faktor rasta hepatocita, retinoičnu kiselinu, glukokortikoidni i NF-kB [62]. Produkovani NGAL protein se vezuje za MMP-9, tako sprečava njegovu degradaciju i povećava enzimsku aktivnost. Za uzvrat MMP-9 aktivnost dovodi do progresije kancera, degradiranjem membrane i ekstracelularnog matriksa, oslobađanjem faktora rasta vaskularnog endotela, (vascular endothelial growth factor-VEGF), omogućavanjem angiogeneze, invazije rasta i metastaza. Najnoviji rezultati istraživanja NGAL u soma tumor ćelijama pokazali su da NGAL, paradoksalno, poboljšano epitelijalnim fenotipom, redukuje rast tumora i suprimira metastaze. Ova moć NGAL je posredovana njegovom sposobnošću da se veže i transportuje gvožđe unutar ćelije [61,62]. Kontradiktorne uloge NGAL u ljudskoj fiziologiji zahtevaju još ispitivanja i dodatnih objašnjenja. Intracelularno preuzimanje NGAL moguće je preko receptora kao što je megalin, a njegovo intracelularno kretanje preko endozoma. Dalji molekularni put NGAL u velikoj meri je zavistan od tipa molekula sa kojima je u kompleksu. NGAL koji je lišen siderofora i gvožđa (holo-NGAL) brzo preuzima intracelularno gvožđe. Trošenje intracelularnog gvožđa rezultuje smanjenjem sposobnosti ćelije za proliferaciju. S druge strane kada se NGAL veže za siderofore i gvožđe sledi brzo oslobađanje gvožđa, sa regulacijom gvožđe-zavisnih molekularnih puteva i nishodnom indukcijom proliferacije i epitelijalne transformacije. Konačno kada je NGAL u kompleksu sa MMP-9 poboljšava se aktivni pul MMP-9 što rezultuje ushodnom regulacijom MMP-9, čija su proangiogena i proinvazivna svojstva dobro poznata. Buduće studije imaju za cilj da unaprede naše razumevanje kompletne biologije NGAL. U neutrofilima i u urinu NGAL je uglavnom prisutan kao monomer, u manjem procentu kao dimer i trimer ili u vidu kompleksa sa 92 kDa humanom neutrofil-kolagenazom tip IV, koja je takođe poznata kao želatinaza B ili matriks metaloproteinaza-9 (MMP-9) [63,64]. U tom kompleksu NGAL štiti MMP-9 od degradacije,

održavajući na taj način njenu proteolitičku aktivnost. Buduće studije imaju za cilj da unaprede naše razumevanje kompletne biologije NGAL. Zbog male molekulske mase i rezistencije na degradaciju, NGAL se lako ekskretuje i detektuje u urinu, u slobodnoj formi i u kompleksu sa MMP-9. Koncentracije u urinu koreliraju sa plazma ili serum koncentracijom bez obzira na uzrok povećanja NGAL, ali naročito visoke koncentracije u urinu mogu da se očekuju kada je NGAL direktno oslobođen u urin od strane bubrežnih tubula ili ćelija karcinoma. Utvrđeno je da se ushodnom regulacijom NGAL eksprimira u ćelijama koje su pod “stresom“, u slučaju inflamacije, infekcije, ishemije ili neoplastične transformacije [65]. Bubrezi nisu jedini izvor NGAL u krvi, u tome učestvuju i drugi organi [66]. Povećano oslobađanje NGAL u cirkulaciju može formirati sistemski depo. U prilog teoriji formiranja sistemskog depoa NGAL ide i činjenica da NGAL ima značajnu ulogu u urođenom imunom odgovoru kao protein akutne faze oslobađa se u cirkulaciju od strane neutrofila, makrofaga i drugih ćelija imunskog sistema. NGAL ima dobre karakteristike kao marker bubrežne funkcije, ali je ujedno i marker inflamacije tako da se ne može primeniti za dijagnozu AKI u svim kliničkim stanjima.

Najveće koncentracije NGAL u krvi ostvaruju se nakon AKI! Svako smanjenje jačine glomerulske filtracije (JGF) smanjuje renalni klirens NGAL i povećava njegovu akumulaciju u sistemskoj cirkulaciji, jer se NGAL filtrira na nivou glomerula i reapsorbuje u proksimalnim tubulima efikasnom megalin posredovanom endocitozom [67]. Koncentracija NGAL može biti pod uticajem brojnih faktora kao što su: hronična bubrežna bolest (HBB), sistemska infekcija, inflamatorna stanja, malignitet [68-70] ali je uvećanje NGAL u ovim situacijama uvek mnogo manje nego u slučaju AKI. Zato, NGAL može predstavljati rani, osetljiv, neinvazivni biomarker za ishemijsko i nefrotoksično oštećenje bubrega. Merenje koncentracije NGAL u serumu (sNGAL) i NGAL u urinu (uNGAL) se pokazalo korisnim u različitim kliničkim stanjima koja mogu dovesti do AKI: kardiohirurške intervencije, transplatacija bubrega, primena nefrotoksičnih agenasa, hemolitičko uremijski sindrom i perinatalna asfiksija novorođenčeta. Razlike u kretanju NGAL kroz nefron u stanjima AKI u odnosu na normalnu bubrežnu funkciju prikazane su na slici 3. Biopsijom bubrega kod pacijenata sa AKI utvrđena je značajna akumulacija imunoreaktivnog NGAL u kortikalnim tubulima [71], što potvrđuje da je NGAL osetljiv marker koji može predvideti razvoj AKI čak i u heterogenoj grupi pacijenata sa brojnim komorbidnim varijablama i nepoznatim vremenskim periodom koji je protekao od oštećenja bubrega. Brojne studije su pokazale da vrednosti NGAL pokazuju visok stepen korelacije sa

trajanjem i stepenom jačine AKI, dužinom boravka u bolnici i stopom smrtnosti. Pored toga, NGAL je i marker hronične bubrežne bolesti (CKD) i pokazuje visok stepen korelacije sa koncentracijom kreatinina u serumu, JGF i proteinurijom [68]. Uobičajeno za predikciju AKI sa NGAL se koriste cut off vrednosti od 150 ng/mL [72,73]. Takođe, koncentracija uNGAL i uNGAL/kreatinin odnos, se mogu koristiti kao osetljivi markeri za ranu detekciju infekcija urinarnog trakta (UTI) u odsustvu akutnog ili hroničnog oštećenja bubrega [74]. Optimalna cut off vrednost za detekciju UTI je niža u odnosu na onu koja se koristi za dijagnostiku AKI (cut off za uNGAL iznosi 20 ng/mL ili 30 ng/mg kreatinina). Koncentracije NGAL u serumu se izražavaju kao apsolutne vrednosti (ng/mL), a NGAL u urinu: kao apsolutne (ng/mL) ili kao normalizovane /standardizovane vrednosti u odnosu na koncentraciju kreatinina u urinu, ovaj odnos biomarker / kreatinin se izražava u (ng/mg uCr). Normalizacija je potrebna kod kritično bolesnih, kod kojih izlučivanje kreatinina varira. Potencijalna korist normalizovanog odnosa je da pojača signal biomarkera. Normalizacija vrednosti biomarkera u odnosu na urinarni protok u posmatranom vremenskom intervalu je razuman pristup, koji bi preciznije odredio izlučivanje i stopu biomarkera, u vremenski ograničenim kolekcijama. Normalizovane vrednosti urinarnog NGAL pogođa varijabilnost urinarne ekskrecije kreatinina, o čemu treba voditi računa, jer u nekim scenarijima normalizacija može pojačati signal biomarkera kao dijagnostičkog sredstva i potencijalno unaprediti njegovu korist, a u drugim pogrešna tumačenja mogu da dovedu do nekritičnog prihvatanja vrednosti normalizovanog biomarkera. Na osnovu rezultata nekih studija predložen je razuman minimalan prag za validaciju biomarkera u AKI, to je dvostruko povećanje normalizovane biomarker vrednosti u odnosu na bazalnu vrednost [75,76].



Slika 1. Kretanja NGAL kroz nefron u zdravom bubregu i u AKI (modifikovano prema referenci Schmi

dt-Ott KM)

NGAL predstavlja novi biomarker za AKI i njegove ishode, ali njegova specifičnost i senzitivnost su najveći u homogenoj populaciji pacijenata sa vremenski predvidljivim oblikom AKI. Plazma NGAL merenja mogu biti pod uticajem mnogih koegzistirajućih varijabli kao što su: hronična hipertenzija, (CKD), sistemske infekcije, uslovi inflamacije, anemija, hipoksija i maligniteti. Povećanje NGAL u ovakvim situacijama generalno je mnogo manje od onih u AKI [77,78].

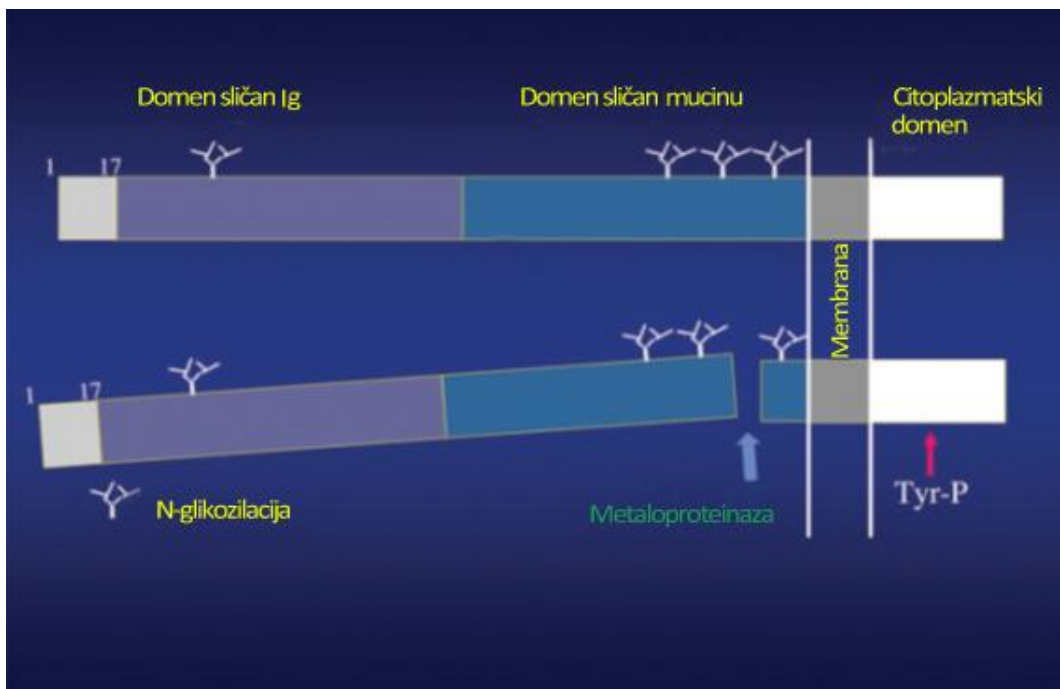
Urinarni NGAL se takođe pokazao kao značajan rani biomarker u pacijenata sa lupus nefritisom, IGA nefropatijom, CKD, i UTI [79]. Međutim nivoi NGAL u ovim situacijama nisu tako značajno povišeni kao u AKI. NGAL je kao AKI biomarker prošao značajna predklinička ispitivanja a u kliničkoj primeni ispitivanja još traju. Trenutno je u potencijalnoj skrining fazi. U pojedinim laboratorijama, testira se na velikim populacijama, u nadi da će biti dovoljan za dijagnozu AKI i ulazak na panel biomarkera. Taj panel bi mogao uključiti i još neke biomarkere kao što su Interleukin 18 (IL 18), KIM-1, Cys C, L-FABP. Dostupnost panela AKI biomarkera mogla bi izazvati revoluciju u daljem lečenju bubrega u bliskoj budućnosti. Studije NGAL počele su davne 2003 godine od kada je Mishra objavio prve radove, prvenstveno na adultnim bolesnicima nakon kardiohirurških intervencija, zatim kod dece nakon kardiohirurgije i novorođenčadi nakon perinatalne asfiksije [49, 53,79,80].

1.2.4.2. Molekul-1 bubrežnog oštećenja:(KIM-1)

KIM-1 je molekul adhezije epitelnih ćelija, koji se u normalnim niskim koncentracijama nalazi u zdravom bubregu. U većim koncentracijama prisutan je u ćelijama proksimalnih tubula posle ishemičnog i nefrotoksičnog AKI, kao transmembranski protein. KIM-1 se lako otkriva u urinu što je prvobitno dokazano u animalnim modelima kod pacova u dva oblika bolesti cysplatin indukovano i ishemičnog AKI [81]. U prvom danu, nakon davanja cysplatinuma urinarni porast KIM-1 je bio tri do pet puta veći od porasta: serum kreatinina, BUN, NAG, uNGAL, glikozurije i proteinurije, koji nisu bili povišeni. U ovoj studiji je korišćen sendvič KIM-1 ELIZA test. Ispitivanja koja su merila koncentracije KIM-1 u urinu eksperimentalnih životinja, izloženih dejstvu različitih nefrotoksičnih supstanci, su pokazala značajan porast koncentracije KIM-1 u urinu nakon razvoja AKI. Nakon tretmana injekcijom gentamicina, žive i hroma, KIM-1 je rano detektovan u urinu eksperimentalnih životinja, brzim test trakicama (dipstiks) a moguće ga je odrediti i imunohistohemijskim metodom. Stepenn intenziteta KIM -1 na tračici je bio u pozitivnoj korelaciji sa urinarnim KIM -1, u dozno i vremenski zavisnom odnosu, kako je mereno histopatološkim oštećenjem i imunohistohemijskim pristupom renalnom KIM -1. U pacova sa adriamicin indukovanoj nefropatijom pre i nakon ACE inhibicije, izmerene vrednosti KIM-1 su korelirale sa proteinurijom i intersticijelnim oštećenjem a redukcija proteinurije je korelirala sa smanjenjem urinarnog i renalnog KIM-1. Sva ispitivanja na

animalnim modelima koja su merila koncentracije KIM-1 u urinu eksperimentalnih životinja, sa razvijenim AKI, nakon izlaganja dejstvu različitih nefrotoksičnih supstanci, su pokazala značajan porast koncentracije KIM-1. Nakon početnih studija na animalnim modelima pojavile su se studije u humanoj populaciji. Broj studija kod ljudi je još ograničen, i one su pokazale prisustvo KIM-1 u proksimalnim tubulima, pri biopsiji bubrega u pacijenata sa prisutnim AKI. Vrednosti KIM-1 su dramatično povišene u postishemičnom bubregu. U bolesnika sa dijagnostikovanom AKI, urinarni KIM-1 je razlikovao ishemični AKI od prerrenalne azotemije i hronične bubrežne bolesti [82]. Skorašnje preliminarne studije su proširile potencijalnu kliničku korist od KIM-1, kao predviđajućeg biomarkera AKI. Nakon početnih studija u adultnih bolesnika pojavile su se studije kod dece, skromno na malom broju ispitanika. U malim kontrolisanim "case control" studijama od četrdesetoro dece podvrgnute operaciji srca, dvadesetoro je imalo AKI, definisano kao 50% porast serum kreatinina. U dece sa AKI, nivoi KIM-1 u urinu su bili povećani u dvanaestom satu posle operacije za AUC od 0.83 [83]. Rezultati humanih i animalnih studija su bili veoma slični. Intenzitet urinarnog KIM-1 na tračici bio značajno izraženiji u pacijenata sa AKI u poređenju sa zdravim kontrolama. Tako je KIM-1 je prihvaćen od strane Food Drug Assotiation (FDA) i Evropske medicinske agencije, kao visoko specifičan i senzitivan urinarni biomarker, za praćenje lekovima indukovano oštećenja bubrega u predkliničkim studijama i kliničkim eksperimentima. U studiji u koju su uključena 32 odrasla pacijenta sa različitim akutnim i hroničnim bubrežnim bolestima sakupljani su uzorci urina, za određivanje koncentracija KIM-1. U šest pacijenata sa akutnom tubulskom nekrozom (ATN) je učinjena je biopsija bubrega, koja je potvrdila ATN. U bioptatu bubrega je identifikovano prisustvo KIM-1 u ćelijama proksimalnog tubula. Urinarni KIM-1 nivoi su bili značajno viši u pacijenata sa ishemičnim ATN u poređenju sa pacijentima koji su imali druge forme akutnog renalnog popuštanja ili hroničnu bubrežnu bolest [84]. KIM-1 je takođe meren u 90 pacijenata koji su prošli operaciju srca, njih 36 je razvilo AKI tokom 72 sata po operaciji. Pored KIM-1 u ovoj studiji su određivane koncentracije i NAG i NGAL. AUC za predviđanje AKI je bio u prva tri postoperativna časa za: KIM-1: 0.68 i 0.65; NAG: 0.61 i 0.63; NGAL: 0.59 i 0.65. Ako se ova tri biomarkera kombinuju (KIM-1, NAG i NGAL) povećava se senzitivnost za ranu detekciju AKI do 0.75 i 0.78 [85]. Prospektivna klinička studija koja je pokazala značaj KIM-1 u predviđanju negativnih kliničkih ishoda, obuhvatala je 201 hospitalizovanih pacijenata sa AKI. Paralelno sa KIM-1 pokazan je značaj i NAG. Pacijenti sa najvišim nivoima KIM-1 i NAG

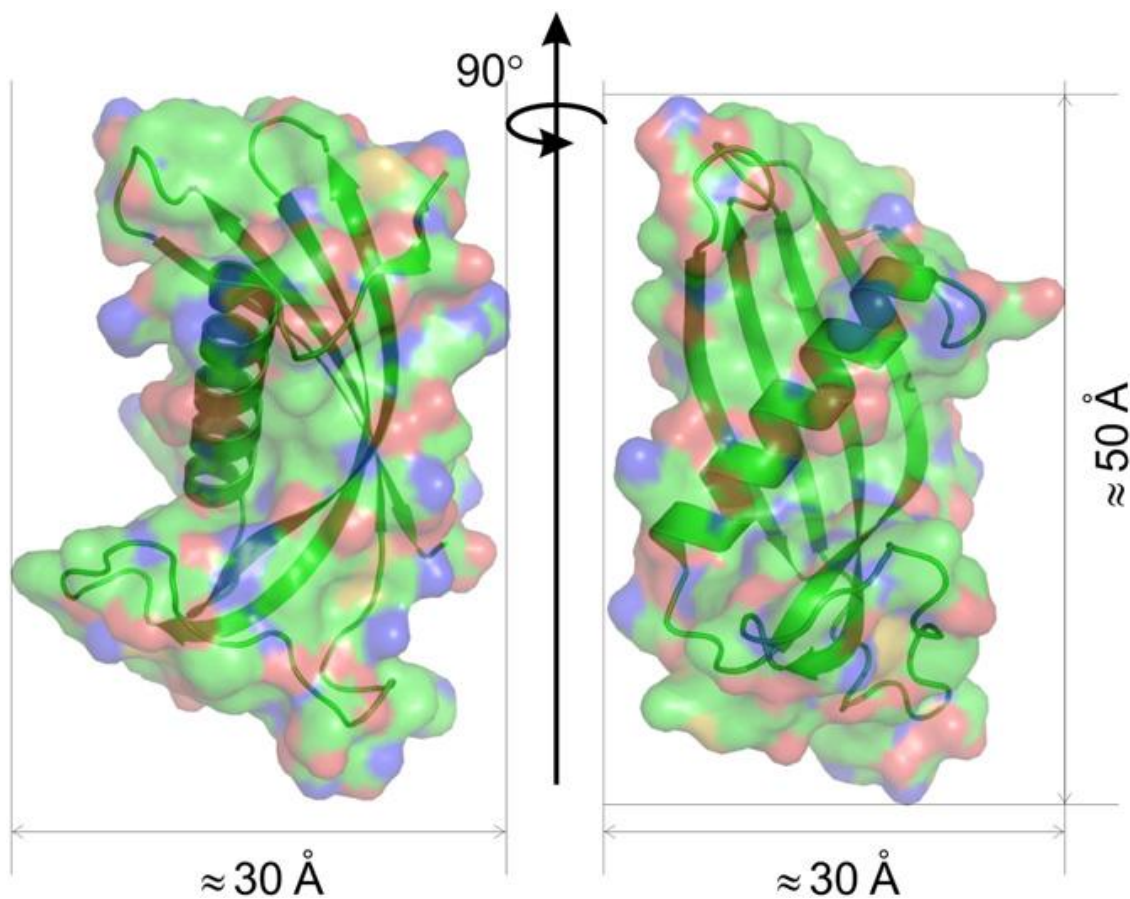
su imali veće potrebe za hemodijalizom i veći broj letalnih ishoda. Ova studija je pokazala da urinarni biomarkeri kao što su KIM-1 i NAG mogu predvideti nepovoljne kliničke ishode u pacijenata sa AKI [86]. Najnovije studije KIM-1 pokazale su njegov veći značaj u brojnim renalnim oboljenjima u kojim je on senzitivn biomarker tubulskog oštećenja. Renalni KIM-1 je bio značajno povećan u tkivu bubrega u pacijenata sa fokalnom glomerulosklerozom, IgA nefropatijom, membranoproliferativnim glomerulonefritisom, membranoznim glomerulonefritisom, kod akutnog odbijanja transplantata, hronične allograft nefropatije, sistemskog lupusa eritematozusa, dijabetičke nefropatije, hipertenzije, Wegenerove granulomatoze u poređenju sa tkivom normalnog bubrega [87]. KIM-1 je normalno prisutan u luminalnoj strani proksimalnih tubula, a povećano u oblastima sa fibrozom i inflamacijom. Renalni KIM-1 je pozitivno korelirao sa oštećenjem bubrega, negativno sa renalnom funkcijom. Urinarni i tkivni KIM-1 su povećani u istim grupama pacijenata i imaju iste pozitivne i / ili negativne korelacije sa drugim bubrežnim biomarkerima. Ova studija je pokazala da je KIM-1 ushodno regulisan u renalnoj bolesti i da je povezan sa renalnom fibrozom i inflamacijom i da urinarni KIM-1 može biti korišćen kao neinvazivni biomarker u brojnim renalnim oboljenjima. Prednost KIM-1 nad NGAL-om je ta da je on specifičniji za ishemijske i nefrotoksične povrede bubrega i nije značajno izmenjen hroničnom bubrežnom bolešću, ni infekcijama urinarnog trakta. Verovatnije je da će se NGAL i KIM-1 pokazati kao sledeći biomarkeri AKI: NGAL kao najosetljiviji pokazatelj prisutan u najranijim vremenskim tačkama, a KIM-1 kao značajan specifikator u malo kasnijim vremenskim tačkama. Stoga je KIM-1 obećavajući kandidat za ulazak na urinarni panel AKI.



Slika 2. Struktura molekula oštećenja bubrega-1 (KIM-1)
(Modifikovano prema referenci Bonventre)

1.2.4.3. Cistatin C (Cys-C)

Među prvim biomarkerima otkrivenim u urinu bio je Cys-C. Otkriven je 1961 godine od strane Butter i saradnika i nazvan Cistatin C. To je protein od 13 kDa. Njegov peptidni lanac sadrži 120 aminokiselinskih rezidua, belančevina niske molekulske težine. Inhibitor je proteinaze. Batter i saradnici su proučavali urin proteine u 223 osobe pomoću skrob gel elektroforeze i našli u postgamaglobulinskoj frakciji novu urinsku frakciju proteina. Dvadeset godina kasnije u Univezitetu Lund u Švedskoj dr Andres Grubb i Helga Lofberg izolovali su i sekvencirali ovaj protein kao deo familije cistatin proteina. Doktor Grubb je napisao značajne radove o Cys-C kao biomarkeru u bubrežnim bolestima. Cys-C je cistein proteazni inhibitor koji se sintetiše i oslobađa u krv u gotovo konstantnom tempu od strane svih ćelija sa nukleusom.



Slika 3. Monomera humanog cystatin C, (dimenzija u Å)

Molekul je savijen kao petostruki antiparalelni beta list zahvaćen oko duge alfa spirale, (leva šema).

U vertikalnoj orijentaciji vidi se alfa spirala koja teče preko konkavne ivice beta lista, (desna šema).

Molekul ima izgled ploče, a najduža dimenzija teče od papain-vezujućeg epitopa na vrhu do slabo strukturiranog dodatnog segmenta na dnu.

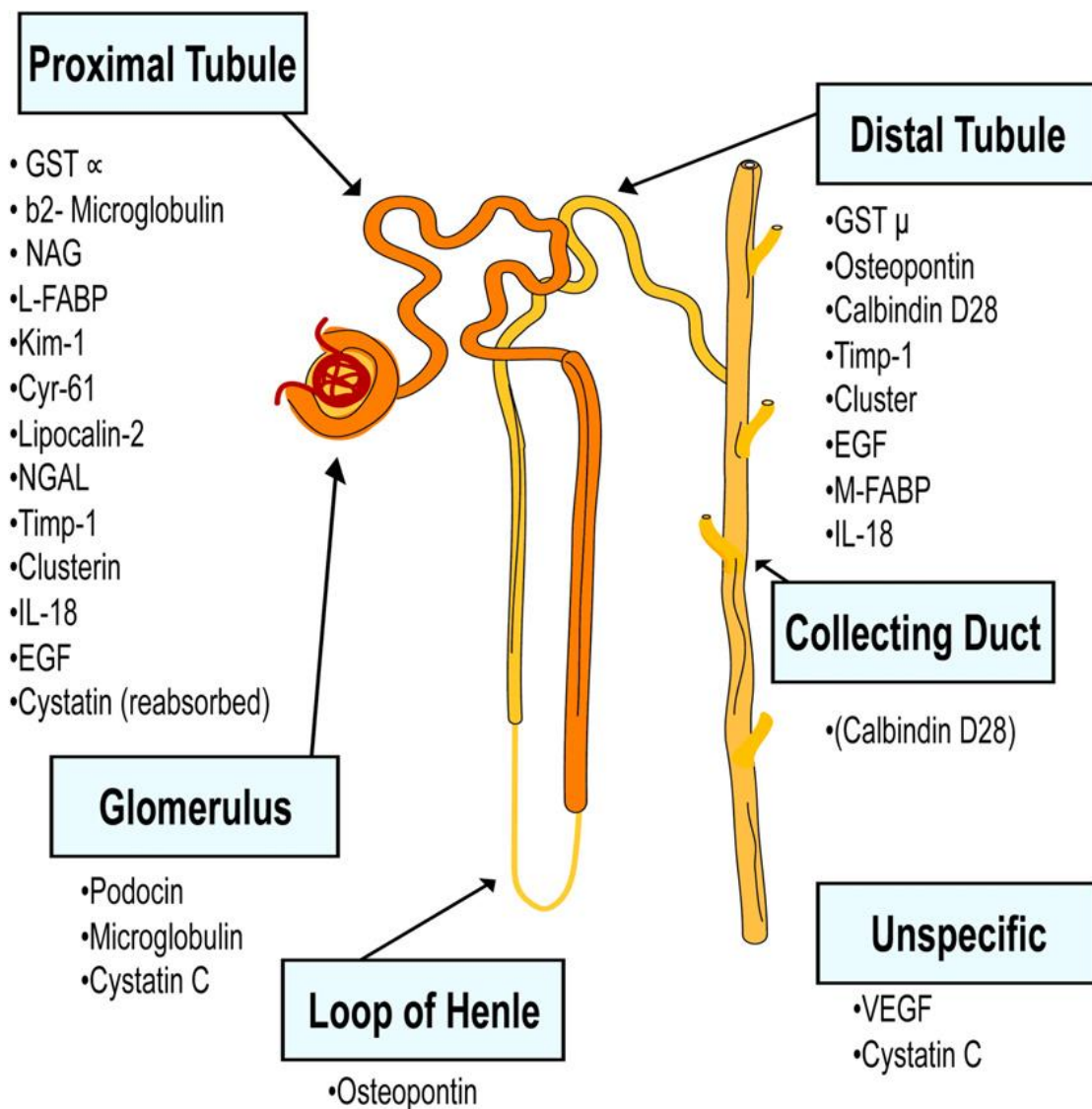
Dimenzije su proračunate za sve nevodonične atome, uključujući lance sa strane, koji su vizuelizovani kao površina molekula (obojena prema tipu atoma), koja okružuje osnovnim crtežom predstavljen glavni lanac. Model atoma isključuje N-terminalni peptid (ostaci 1e11) koji je normalno poremećen, i ne može se pratiti u kartama gustine elektrona.

(Modifikovano prema referenci Uwe Cristiansen)

On se slobodno filtrira u glomerulima, kompletno reapsorbuje u proksimalnom i ne sekretuje u distalnom tubulu. Izgleda da se Cys-C izbacuje iz organizma skoro isključivo glomerulskom filtracijom. To ga čini obećavajućim endogenim biomarkerom JGF [88]. Za razliku od kreatinina ne prolazi placentalnu barijeru i visok serumski nivo Cys-C po rođenju verovatno odražava stepen maturacije glomerulske filtracije [10]. Tokom prve godine života nivoi Cys-C opadaju a JGF raste. Nivoi Cys-C u krvi ne zavise značajno od starosti, pola, rase ili mišićne mase, zato je on bolji prediktor glomerulske funkcije nego serum kreatinin. U Nemačkoj je 2002 godine, održan multinacionalni skup posvećen Cys-C, kada je istaknuto da je Cys-C kao marker JGF, bar jednak ako ne i superiorniji od serum kreatinina. Cys-C je nezavistan od visine, pola, rase, uzrasta i mišićne mase. Dobrobit od upotrebe Cys-C kao biomarkera mogu imati selektovane grupe pacijenata, deca ili stariji pacijenti sa redukovanom mišićnom masom [89]. Promene u koncentracijama Cys-C javljale su se ranije, nego promene u koncentracijama serum kreatinina. To su sve značajne prednosti Cys-C kao biomarkera AKI. Cys-C se najbolje meri imunonefelometrijskim esejom. U studijama u kojima je korišćen Cr-EDTA (klirens kao referentni standard), koncentracija Cys-C u krvi, identifikovana je kao mera JGF [90]. Sledeće studije su pokazale da je Cys-C je bolji marker JGF od serum kreatinina i da koncentracija Cys-C raste pre koncentracije kreatinina u serumu bolesnika sa AKI: Herget Rosenthal je proučavao pacijente nakon uninefektomije za donaciju sa živog donora. Serum Cys-C je porastao u prvom danu nakon uninefektomije, u poređenju sa serum kreatininom koji je kod istih pacijenata porastao u drugom danu [91]. U studiji 85 adultnih pacijenata sa visokim rizikom za razvoj AKI, ispitivano je da li je Cys-C detektovao AKI pre nego serum kreatinin? AKI je bilo definisano prema RIFLE klasifikaciji. Porast serumskog Cys-C veći od 50% registrovan je ranije za 0,6 dana nego što se javio porast u serum kreatininu. Serum Cys-C je takođe pokazao visoku dijagnostičku vrednost za detekciju AKI, kako je indikovano AUC-ROC, dva dana pre nego što je R, "rizik od renalne disfunkcije" kriterijum, ostvaren pomoću kreatinina. Ova studija je zaključila da je serum Cys-C koristan za detekciju AKI i može ga detektovati pre serum kreatinina za jedan do dva dana [92]. Da je Cys-C bolji marker JGF od serum kreatinina, pokazale su i sledeće studije: serum Cys-C i Cys-C bazirane formule su bile podjednako dobre u proceni JGF kao i formula Modifikacije Dijete Renalne Bolesti (MDRD) [93]. Uzun i saradnici su proučavali dijagnostički značaj Cys-C koristeći non-kreatinin merenja JGR [94]. Serum ^(99m)Tc-DTPA klirens je upoređen sa serum Cys-C, 10-

60ml/min/1,73m² i zdravim kontrolama. Referentni klirens određen serumskim ^(99m)Tc kreatininom, β₂ mikroglobulin nivoima i klirensom kreatinina u grupi pacijenata sa JGF od Tc-DTPA je najbolje korelirao sa klirensom kreatinina (r=0.957); Cys-C (r=0.828); u poređenju sa β₂ mikroglobulinom (r=0,767) i kreatininom (r=0.682). Pošto su ovi pacijenti imali JGF manju od 60ml/min/1,73m², zaključeno je da serum Cys-C nivoi mogu biti korišteni kao markeri JGF u pacijenata sa oštećenjem bubrega [95]. Artunc i saradnici su uporedili serum kreatinin, serum Cys-C i klirens jodnih kontrasta koji boji jodpromid (referentni standard) u 127 pacijenata kod kojih je rađena kateterizacija srca. Serum Cys-C je pokazao višu neparametrijsku korelaciju (r=0.805), sa klirensom jodpromida u poređenju sa klirensom kreatinina (r=0.652) i u poređenju sa GFR procenjenim Cockcroft-Gault formulom (r=0.69). Serum Cys-C vrednosti više od 1.3 mg/L pokazale su 88% senzitivnost i 96% specifičnost za detekciju oštećenja bubrega (jodpromid klirens manji od 80ml/min/1,73m²) [96]. Ispitivanja su pokazala da urinarna ekskrecija Cys-C može da predvidi potrebu za terapijom zamene bubrega u pacijenata sa dijagnostikovanim AKI oko jedan dan pre porasta serumskog kreatinina sa AUC-om od 0,7 [97]. O Cys-C su se pojavile brojne studije kod odraslih, ali broj studija kod dece takođe raste. U populaciji dece najnovije studije pored mogućnost serumskog Cys-C i NGAL-a u predviđanju AKI, koji prati operacije srca u dece. Od 129 pacijenata kod 41 se razvilo AKI, definisano kao 50% porast serumskog kreatinina, jedan do tri dana nakon kardiopulmonalnog by pass. Takođe prospektivna opservaciona studija na 25 dece u ICU, kojoj su mereni Cys-C i β₂-mikroglobulin (B₂-M) da identifikuju stepen klirensa kreatinina i Schwartz-stepen klirensa kreatinina ispod 80ml/min/1,73m² je bio bolji nego pomoću kreatinina (AUC-ROC=0.851) i pomoću Cys-C (AUC-ROC= 0.792); (0.802 i 0.799 za B₂M) i (0.633 i 0.625 za kreatinin). Ova studija je zaključila da su serum Cys-C i B₂-M bili bolji od serum kreatinina u detekciji AKI u kritično bolesne dece. Studije koje su poredile NGAL i Cys-C su pokazale da su u slučajevima AKI, serum NGAL nivoi porasli nakon dva sata postoperativno, dok su serum Cys-C nivoi porasli tek nakon dvanaest sati. Oba biomarkera i Cys-C i NGAL u dvanaestom satu su bili jaki nezavisni pokazatelji AKI, ali je NGAL nadigrao Cys-C u ranijim vremenskim tačkama. Zato su oba biomarkera i Cys-C i NGAL obećavajući kandidati za uvrštavanje u krvni panel AKI. Cys-C ima neke prednosti a to su: komercijalna dostupnost standardne imuno nefelometrijske analize, koji je automatizovan i obezbeđuje rezultate u minutima. Rutinski klinički uslovi čuvanja: ciklusi lediti/topiti, prisustvo interferirajućih supstanci i etiologija AKI

ne utiču na merenja i vrednosti Cys- C u serumu. Tokom kontinuirane veno-venske hemofiltracije (CVVH), kvantitet uklonjenog Cys-C je manji od 30% od njegove produkcije i nisu uočene brze promene u njegovoj serum koncentraciji [98]. Ova studija sugerise da je malo verovatno da će CVVH značajno uticati na serum koncentracije Cys-C i da Cys-C može biti korišćen za praćenje rezidualne bubrežne funkcije tokom CVVH. Poslednjih nekoliko godina pojavile su se studije koje ispituju značaj Cys-C kod kritično bolesne novorođenčadi i čiji rezultati daju nadu za implementaciju Cys-C u kliničkoj praksi [99].



Slika 4. Proteom bubrega (modifikovano prema referenci Uwe Christians)

Slika predstavlja proteinske markere bubrežnog oštećenja i njihovo mapiranje na nefronu.

Prikazani su potencijalni marker proteini do sada najčešće pominjani u literaturi, zato ovaj spisak ne smatramo potpunim. Mapiranje predstavlja najzastupljenije lokacije, ali za pojedine proteine je suviše pojednostavljeno [100].

1.2.4.4. Jetreni tip vezujućeg protein za masne kiseline (L-FABP);

L-FABP je protein od 14 kDa, koji pripada porodici nosećih proteina za masne kiseline i druge lipofilne supstance kao što su eikozanoidi i retinoidi. Normalno stvara u proksimalnom tubulu bubrega. L-FABP olakšava prenos masnih kiselina između ekstraćelijskih i intraćelijskih membrana. Kao i kod drugih biomarkera studije o L-FABP su prvobitno izvedene na životinjskim modelima a kasnije u humanoj populaciji. U indukovanoj nefropatiji kod miševa, L-FABP je povezan sa stepenom tubulointercijalnog oštećenja u modelu folne kiseline [101]. Urinarni tip L-FABP je meren u miševa sa ishemičnim AKI i cisplatin indukovanim AKI. Nivo porasta humanog L-FABP u oba bubrega i urinu je u pozitivnoj korelaciji sa stepenom tubulointercijalnog oštećenja, infiltracijom makrofaga i deponovanjem kolagena tipa I. U oba oblika bolesti urinarni L-FABP je povećan u urinu pre povećanja BUN. Rezultati histoloških pregleda bubrega pogoršali su se sa dužim ishemičnim AKI i rastućim dozama cisplatina. U oba modela AKI urinarni L-FABP je pokazao bolju korelaciju sa obimom histoloških povreda i GFR, mereno fluorescein izotiocijanatom obeleženom inulin injekcijom, nego sa BUN i mokraćnom N acetil D glukozaminidazom [102]. U humanim ispitivanjima L-FABP je ocenjen kao pokazatelj bubrežne ishemije u pacijenata sa transplaciranim bubregom [103]. U 12 pacijenata sa transplantacijom bubrega video analiza intravitalno peritubularnih kapilara, je pokazala da je protok krvi započeo odmah nakon reperfuzije presađenog organa. Uočena je direktna pozitivna korelacija između urinarnog L-FABP nivoa i oba faktora: peritubularnog protoka krvi u kapilarima i ishemijskog vremena od presađenog bubrega, kao i dužine boravka u bolnici. L-FABP nivoi su mereni u urinu i serumu kritično bolesnih pacijenata. Urinarni nivoi u L-FABP

kod pacijenata sa sepsom, pacijenata sa AKI i kod zdravih osoba ($p < 0.001$). Nivoi L-FABP su pokazali da nema značajne razlike između pacijenata sa septičnim šokom, pacijenata sa teškom sepsom pacijenata sa AKI i zdravih osoba. U studiji koju su izveli Portilla i saradnici u pedijatrijskoj populaciji urinarni L-FABP je meren u 40 dece pre i nakon kardiopulmonalnog baj-pasa. Enzimaska analiza povezana sa imuno upijačem pokazala je porast nivoa L-FABP oko 94 puta i 45 puta na 4 i 12 puta, tim redom nakon operacije u 21 pacijenta koji je razvio AKI. Vestern blot analiza je potvrdila prisustvo L-FABP enzima u urinu. Oba faktora i vreme baj-pasa i L-FABP nivoi značajni su nezavisni faktori rizika za AKI. Ova studija pokazuje da su urinarni nivoi L-FABP predstavljaju rani osetljiv prediktor AKI posle kardiohirurgije [104,105]. Studija Peco-Antić i saradnika izvedena u dece nakon kardio-hirurgije u kojoj je procenjivan značaj urinarnog L-FABP kao ranog biomarkera AKI je pokazala da je L-FABP rani osetljiv AKI biomarker u dece nakon kardiohirurgije u: 2, 6, 24 i 48 satu postoperativno, sa AUC-ROC 0.84, 0.89, 0.75, 0.87 [90]. Potrebne su velike multicentrične studije L-FABP koje bi potvrdile njegove sposobnosti i značaj kao ranog biomarkera AKI.

1.2.4.5. Epidermalni faktor rasta: (EGF)

Epidermalni faktor rasta je 53 amino-kiselinski peptid A koji je proizveden u ascedentnom delu Henleove petlje i distalnom segmentu bubrega. Čini se da modulišu odgovor tkiva na povrede u bubrezima i tubulointercijumu [192,195].

1.2.4.6. Fibroblastni faktor rasta: (FGF23)

FGF 23 je protein koji se luči normalno u kostnoj srži, timusu, srcu, i u niskim koncentracijama u drugim tkivima. On je glavni regulator homeostaze fosfata. Može da deluje zajedno sa nekoliko manje značajnih regulatora fosfora. Visok nivo fosfata u krvi stimuliše ekspresiju i sekreciju FGF23, čiji mehanizam dejstva još uvek nije jasno razumljiv. Samo intaktan FGF23 se smatra biološki aktivnim. FGF23 predviđa odgovor na tretman kalcitriolom ili na analoge D vitamina kod pacijenata sa bubrežnom insuficijencijom. U tom pogledu značajan je biomarker u praćenju bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom [106,107,108].

Ispitivanja FGF23 su počela na animalnim modelima, nivoi FGF23 su počeli da se povećavaju unutar jednog sata od indukovanog AKI kod miševa. To povećanje je prethodilo povećanju NGAL. Nivoi FGF23 su u korelaciji sa izračunatom JGF i niži u pacijenata na dijalizi sa rezidualnom bubrežnom funkcijom. Moglo se pretpostaviti da je rani porast FGF23 posledica akutnog smanjenja renalnog klirensa FGF23. Međutim skromno povećan polu-život intravenozno datog FGF23 kod miševa sa AKI u odnosu na kontrolnu grupu ne može objasniti njegovo značajno povećanje. Ovo sugerise da uprkos jakoj obrnutoj korelaciji između FGF23 i JGF, u insuficijenciji bubrega FGF23 klirens nije primarni mehanizam za povišenje nivoa FGF23 u stanjima smanjene bubrežne funkcije, kao što se ranije mislilo. U stvari imunohistohemijske i Western blot analize kostiju potvrđuju povećanu proizvodnju FGF23, kako je primećeno u ranijim animalnim i humanim studijama CKD. Konačno ovi rezultati ukazuju da povećana proizvodnja a ne smanjena eliminacija vodi u povišene nivoe FGF23 u AKI i verovatno u CKD.

1.2.4.7. N acetyl β glucosamidase (NAG)

NAG je protein (> 130 kDa), koji je takođe jedan od obećavajućih biomarkera AKI. Povećane koncentracije NAG u urinu zabeležene su nakon izlaganja bubrega nefrotoksičnim lekovima, kod pacijenata sa odloženom funkcijom alografta, onih sa akutnim bubrežnim oštećenjem, sa hroničnom glomerulskom bolešću, ili dijabetском nefropatijom ili nakon kardio-pulmonalnog baj-pasa. Koristan je u dijagnozi AKI, sam ili u kombinaciji sa drugim biomarkerima.

2. CILJEVI

1. Ispitati učestalost AKI u pretermiske novorođenčadi sa perinatalnom asfiksijom
2. Testirati savremenu klasifikaciju AKI u najranijem životnom dobu, neonatalnom periodu kod pretermiskog novorođenčeta sa perinatalnom asfiksijom
3. Metodom komparacije ustanoviti pouzdanost klasičnih biohemijskih nalaza: kreatinina, diureze u odnosu na nove urinarne i krvne biomarkere u najranijem i najpouzdanijem postavljanju dijagnoze AKI
4. Proceniti prednosti novih biomarkera u odnosu na standardne biohemijske analize u ranom određivanju bubrežnog oštećenja
5. Ispitati uticaj gestacije i postnatalne dobi na pomenute biomarkere kod pretermiske novorođenčadi sa perinatalnom asfiksijom

3.METOD RADA

Ovo istraživanje predstavlja opservacionu, prospektivnu studiju koja je izvedena u periodu od januara 2009 godine do decembra 2012 godine u Institutu za neonatologiju u Beogradu.

3.1. Ispitanici

Svi ispitanici su upućivani iz porodilišta ili regionalnih centara u Institut za neonatologiju, zbog nezrelosti ili nekog od problema adaptacije u najranijem neonatalnom periodu. Ispitanu populaciju čini 108 pretermijske novorođenčadi. Gestacijska zrelost određena je prema datumu poslednje menstruacije i/ili antenatalnom ultrazvuku i potvrđena Ballard skorom u postnatalnom periodu [106]. Ova novorođenčad su imala perinatalnu asfiksiju (PNA) i AKI nastao u ranom neonatalnom periodu [107]. Pokazatelj perinatalne asfiksije je bio $AS \leq 7$ u petoj minuti života ili pH krvi na prijemu ≤ 7.20 . AKI je dijagnostikovano na osnovu porasta vrednosti serum kreatinina $sCr \geq 26.52 \mu\text{mol/L}$ ili 0.3 mg/dL , u odnosu na bazalnu vrednost. Najniža prethodna vrednost sCr služila je kao njegova bazalna vrednost. AKI je definisan u skladu sa savremenom definicijom bolesti bubrega; po definiciji: Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO), modifikovanom za novorođenče [108,109].

3.1.1 Kriterijum za uključivanje u studiju

Novorođenčad uključena u studiju su ispunjavala sledeće kriterijume:

Da nemaju konatalnu anomaliju bubrega i mokraćnih puteva

Da nemaju konatalnu anomaliju srca niti velikih krvnih sudova

Da nemaju neku genske bolesti, metaboličke bolesti ili neku drugu anomaliju

Da imaju perinatalnu asfiksiju $pH \leq 7.20$ i/ili Apgar skor $AS \leq 7$ u petom minutu života.

3.1. 2 Kriterijum za isključivanje iz studije

Novorođenčad sa konatalnim anomalijama bubrega, mokraćnih puteva, srca i velikih krvnih sudova

Novorođenčad sa intrauterusnim zastojem rasta

Novorođenčad sa nekom od grešaka metabolizma

Novorođenčad sa nekom genskom bolešću

Novorođenčad sa neonatalnom sepsom ili UTI

Novorođenčad majki koje su imale hroničnu bubrežnu bolest, hipertenziju, preegzistirajuću ili trudnoćom indukovanu, neku sistemsku bolest, dijabetes melitus, hroničnu bubrežnu insuficijenciju ili neku drugu hroničnu bolest.

3.2. Varijable istraživanja i metode merenja

3.2.1. Varijable istraživanja

U ovom istraživanju ispituje se akutno oštećenje bubrega (AKI) novorođenčeta, izazvano perinatalnom asfiksijom. Kao pokazatelji perinatalne asfiksije analizirani su Apgar skor i pH krvi na prijemu u Institut. Na obe varijable, PNA i AKI najveći uticaj imaju:

3.2.1.1 Instrumenti istraživanja

Izvore podataka predstavljaju merenja: serumskog kreatinina, ureje, elektrolitnog statusa urina i seruma, određivanje diureze, merenje krvnog pritiska, telesne mase na prijemu i aktuelne telesne mase, kao i podaci dobijeni iz istorija bolesti majke i novorođenčeta uključujući: porođajnu telesnu masu, telesnu dužinu, Apgar skor u prvom i petom minutu života, pH vrednost i BD na rođenju. Iz istovremeno uzetih uzoraka urina i seruma izmerene su vrednosti novih biomarkera: uNGAL, sNGAL, KIM1, α_1 -mikroglobulina, β_2 -mikroglobulina, IL₁₈. Ove vrednosti su rađene kao slepe probe, njihove izmerene vrednosti nisu imale značaja u kliničkom tretmanu novorođenčadi niti uticaj na postavljanje dijagnoze AKI. Većina vrednosti biomarkera nije bila izmerena neposredno po uzimanju, nego nakon sakupljenog određenog broja uzoraka i čuvanja na -80°C.

3.2.1.2 Metode merenja kreatinina i ranih biomarkera

Kreatinin je određivan Jaffe metodom iz svežih uzoraka krvi i urina. Merenje biomarkera je u prvom danu hospitalizacije izvedeno tri puta u 2, 4, 6 satu po prijemu u OIN. U prvom danu svi ispitanici su imali jedan uzorak urina, a samo mali broj tri, kako je protokolom studije planirano. U trećem i sedmom danu života ovaj deo protokola je u većem procentu ostvaren. U rezultatima je prikazan tačan broj uzoraka koji su u određenim vremenskim tačkama izmereni. Prema vrednostima kreatinina i procenjenom klirensu kreatinina (eCCl) koji je izračunat prema Švarcovej formuli, modifikovanoj za novorođenčeta sa $k=29.2$ postavljena je dijagnoza AKI novorođenčeta. Prema prisustvu ili odsustvu AKI novorođenčad su svrstana u dve grupe u AKI ili ne-AKI grupu ispitanika. To je osnovna podela, a zatim je u AKI podgrupi, prema standardima AKIN klasifikacije izvršena podela na AKIN1 (porast sCr za 1.9 od osnovne vrednosti) i AKIN2 (porast sCr od 2.0-2.9 od osnovne vrednosti). U našem ispitivanju nisu registrovani AKIN3 slučajevi. Statističkom analizom izvršeno je poređenje među grupama i podgrupama.

Tabela 5. Prikaz broja ispitanika u svim vremenskim tačkama, za stare biomarkere pojedinačno, u AKI/AKIN1/AKIN2 grupama

Vreme	Konvencionalni Biomarkeri (n-broj novorođenčadi)					
	Cr Urin	AKI n=73	AKIN1 n=61	AKIN2 n=12	Alfa-1	Beta-2
2h	32	73	61	12	18	42
4h	103	73	61	12	108	42
6h	83	73	61	12	108	108
3 dana	106	73	61	12	108	108
7 dana	106	71	61	10	102	106

Prikaz broja ispitanika u odnosu na stare, konvencionalne biomarkere, sCr na osnovu čije vrednosti je napravljena osnovna podela na AKI i ne-AKI grupe, kao i dalja podela na podgrupe AKIN1 i AKIN2.

3.2.1.3 Merenje novih biomarkera

Neki od ispitivanih novih biomarkera mereni su u krvi i urinu (sNGAL i uNGAL), neki samo u urinu KIM-1. Za merenje sNGAL bili su potrebni uzorci krvi od (1.0-1.5 ml), koji su uzimani pet puta tokom ispitivanja: u prvom danu u tri vremenske odrednice u 2, 4 i 6 satu po prijemu u OIN, zatim po jedan put u trećem i sedmom danu hospitalizacije. Uzorci krvi su centrifugovani na 1000 x g tokom deset minuta. Izdvojeni serum je zamrzavan na -80⁰C do analize. Analiza sNGAL izvršena je upotrebom human-specifičnih komercijalno dostupnih enzimskih imunotestova (ELISA), (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnessota, USA), prema preporukama proizvođača. Koncentracije sNGAL izražene su u ng/mL. Na osnovu naših rezultata, tačnost analitičkog testa je bila sledeća: unutar ogledni koeficijent varijacije (CV) 3.7%, među test varijacije 6.5%, sa linearnošću od 0.156 ng/mL i osetljivošću od 0.012 ng/mL. Unutar i između testova korišćeni metod je visoko precizan. Standardne koncentracije za ove analize bile su: 5ng/mL, 2.5ng/mL i 125ng/mL za humani lipokalin -2 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnessota, USA). Pre grupne analize svakog pacijenta, uradili smo pilot studiju kako bi se utvrdila najveća moguća koncentracija i najbolje razblaženje za grupu. Odabrali smo deset uzoraka sa najvećim koncentracijama sCr, a takođe našli u literaturi NGAL koncentracije za sličan broj ispitanika. Očekivali smo najviše koncentracije od 300 ng/mL i koristili: 1:20, 1:40, 1:80 i 1:100 razblaženja. Razblaženja su vršena sa originalnim R&D Systems Inc. reagensom za razblaživanje. Imamo najniže CVs 1:80 razređenja i to razblaženje smo koristili za dalje analize. Za one uzorke koji imaju koncentracije ispod najnižih tačaka u standardnoj krivoj, smo ponovili analizu sa nižim razblaženjem 1:40. Serum kreatinin koncentracije su merene korišćenjem Jaffe metode reagens proizveden (Human Wiesbaden, Germany) na auto-analizatoru (Siemens Healthcare GmbH, Germany), koristeći reagens Human Wiesbaden Germany). Intra-assay CVs je bio 2.0% i 1.34% za kreatinin koncentracije od 122 μ mol/L i 350 μ mol/L tim redom. Izvršili smo analizu NGAL svakih šest meseci kako bi se sprečila razlika između serija ispitivanja. Stabilnost NGAL na -80⁰C prema Han i saradnicima (19) je do jedne godine, prema Pedersenu i saradnicima do 11 meseci (20). Laboratorijska ispitivanja su bila slepa za kliničke

ishode. Diureza je sistematično merena skupljanjem urina u plastične vrećice ili putem urinarnog katetera. Novorođenčad nisu primala diuretike u prvih 48 sati života.

U urinu ispitivane novorođenčadi je meren uNGAL. Vrednosti su izražene kao apsolutne u (ng/mL) ili kao standardizovane / normalizovane u odnosu na vrednosti urinarnog kreatinina (uCr) što je izraženo kao (ng/mg uCr). U odeljku rezultati sve izmerene vrednosti su izražene u [SI sistemu jedinica: (nmol/L), kao apsolutne ili u (nmol/mmol uCr), kao standardizovane vrednosti] i u [Metričkom sistemu jedinica, kao apsolutne (ng/mL) ili u (ng/mg u Cr) kao standardizovane vrednosti]. Oliguriju smo definisali kao diurezu < 0.5ml/kg/h. Novorođenčad u NICU su imala vrhunsku postnatalnu negu. Sva novorođenčad su negovana u inkubatoru i imala po protokolu NICU (inicijalnu antibiotsku terapiju, oksigenoterapiju, intravenski unos vode i elektrolita, često oksigenoterapiju; difuznim kiseonikom, nekada i mehaničku ventilaciju, neinvazivnu ili konvencionalnu). Sve kliničke i istraživačke aktivnosti urađene su u skladu sa principima Helsinške Deklaracije a studiju je odobrio Etički odbor Medicinskog Fakulteta u Beogradu i Etički odbor Instituta za neonatologiju u Beogradu. Pisana saglasnost za učešće u studiji dobijena je od roditelja ispitivane novorođenčadi.

3.2.1.4 Metode odabira i karakterizacija novorođenčeta

Anamneza: klinička procena zdravstvenog statusa ispitivane novorođenčadi temelji se na kompletnoj bazi kliničkih informacija sa evidentiranom standardizovanom formom podataka. Procena je uključila opšte personalne generalije, ličnu i porodičnu anamnezu, perinatalnu anamnezu, anamnezu trudnoće i porođaja, preegzistirajućih bolesti majke, karakteristike transporta novorođenčadi, sadašnju bolest. Detaljno su analizirani podaci iz anamneznog lista majke, njenoj životnoj dobi, paritetu, o njenom zdravstvenom stanju, kondicijama pre aktuelne trudnoće, tokom trudnoće i drugim specifičnostima koje su mogle imati uticaj na tok i ishod trudnoće. Posebno su izdvojene informacije koje su se odnosile na krvni pritisak majke, edeme, proteinuriju, porast telesne mase u aktuelnoj trudnoći, kao i trudnoćom indukovanu hipertenziju. Analizirani su biohemijski i ultrazvučni pregledi tokom trudnoće. U studiju nisu uključena novorođenčad majki koje su imale preegzistirajuću bolest bubrega ili se ona ispoljila tokom trudnoće. Značajno je istaknuta primena medikamenata u trudnoći posebno onih koji deluju na

krvni pritisak fetusa i novorođenčeta. Korišćeni su rezultati prenatalnog i postnatalnog ultrazvučnog pregleda unutrašnjih organa fetusa da bi se iz ispitivanja isključila deca sa konatalnim anomalijama. Detaljno su studirani podaci o samom porođaju, dužini trajanja, načinu završavanja, primeni akušerskih intervencija i detaljima o eventualnoj prenatalnoj, intrapartalnoj i ranoj neonatalnoj patnji.

Klinički pregled:

Fizikalni pregled je obuhvatio kompletan fizički pregled novorođenčeta uključujući procenu težine kliničkog stanja, gestacije i uhranjenosti. Određuje se aktuelna telesna masa na dan pregleda. Opisuje se koža, njena boja, turgor, elasticitet i stanje hidracije. Ukoliko su prisutni beleže se znaci hiperhidracije: edemi lokalizovani i generalizovani, skleredem ili prisustvo slobodne tečnosti u telesnim dupljama, nabrekle vene vrata, pukoti na plućima, edem pluća. Nekada je izražena dehidracija, suva koža, upale oči, ispucale vidljive sluznice, uvučena velika fontanela. Učinjen je poseban osvrt na pregled abdomena, genitalija i leđa (sakro-kokcigealne regije), prisustvo okultnog sakralnog disrafizma ili fovea sacralis. Nekada se palpiraju uvećani bubrezi, tumorske mase u abdomenu, prepunjena mokraćna bešika. Mogu biti prisutni znaci od strane kardio-vaskularnog sistema: nabrekle vene vrata, izražen venski crtež na prednjem trbušnom zidu. Izmereni krvni pritisak može biti normalan, povišen ili snižen. Na srcu se često registruju: tahikardija, poremećaji srčanog ritma, znaci hipertenzivne krize ili hipotenzivnog šoka. Na plućima može biti izražen edem pluća uz masu pukota obostrano. Obavezan je neurološki pregled koji može registrovati različite poremećaje stanja svesti od somnolencije preko sopora do kome, nekada se registruju konvulzije.

Monitoring: Intenzivan 24 satni monitoring diureze, krvnog pritiska, srčane frekvence, EKG, saturacije hemoglobina kiseonikom i aktuelne telesne mase.

3.2.1.5 Laboratorijske analize

Laboratorijske analize su izvršene su u hematološkoj, biohemijskoj i drugim laboratorijama Instituta za neonatologiju. Uzorci krvi i urina pripremani su i centrifugovani, a

zatim zamrzavani takođe u laboratoriji Instituta za neonatologiju. Merenja samih biomarkera su učinjena na Farmakološkom Fakultetu u Beogradu. Odmah po prijemu novorođenčeta uzima se:

Krv: Iz krvi su određivani: kompletna krvna slika na prijemu, CRP, standardni biohemizam krvi: glikemija, ukupni proteini i albumini, kreatinin, ureja, elektrolitni status, osmolalnost krvi i gasne analize po Astrup-u. Iz uzoraka seruma uzetih na prijemu, prvom danu hospitalizacije, određene su vrednosti serumskog Cystatina C i serumskog NGAL. Iste analize su ponovljene u trećem i sedmom danu.

Urin: Pregled urina je izvršen po uspostavljanju mikcije, i obuhvatio je već iz prvog uzorka urina, kompletan pregled urina, izgled, boja, specifična težina, proteinurija, glikozurija, sediment urina: elektroliti, leukociti, epitelne ćelije, cilindri i kristali. Određeni su osmolalanost urina, elektrolitni status i ureja i kreatinin u urinu. U svakom vremenski definisanom, precizno obeleženom uzorku urina određene su vrednosti urinarnih biomarkera: uNGAL, u Cys-C, KIM1, α_1 -mikroglobulin i β_2 -mikroglobulin. Iste analize u urinu su ponovljene u trećem i sedmom danu.

Bakteriološka obrada je obuhvatila : hemokulturu i urinokulturu i briseve kože.

Kod svih je učinjena radiološka i ultrasonografska evaluacija bubrega i mokraćnih puteva.

Antropometrijska merenja novorođenčadi, na prijemu: telesna masa na prijemu, telesna dužina, obim glave i grudnog koša. Na prijemu je procenjena gestacijska zrelost, uhranjenost novorođenčeta i obavljen kompletan klinički pregled.

Izmerena vrednost telesne dužine se koristi za procenu eCCl, odnosno indirektno glomerulske filtracije (JGF). Ova procena se vrši modifikovanom Svarcovom formulom:

$$\text{GFR} = \frac{\text{TVx k}}{\text{sCr}} ; \quad (\text{k} = 29.2 \text{ za novorođenče})$$

Sve navedene analize učinjene su u Institutu za neonatologiju i Farmakološkom fakultetu u Beogradu. Nivoi α_1 -mikroglobulin i β_2 -mikroglobulin su određeni u laboratoriji Hexalab.

3.2.1.6 Metodologija određivanja biomarkera

Nivoi biomarkera su određivani komercijalnim ELISA testom (DRG human, ELISA DRG International, Inc, USA). Reč je o sendvič imunohemijskom testu sa enzimom kao obeleživačem, koji služi za kvantitativno merenje biomarkera u serumu, urinu, plazmi i tkivnim kulturama. Intenzitet boje se meri spektrofotometrijski na ELIZA čitaču Stat fax 303 Plus (Awareness Tecnology, Inc, USA). Za određivanje biomarkera u serumu, plazmi i urinu potrebno je 10 µl uzorka.

Mikroalbuminurija je pojava niskih koncentracija albumina u urinu, koje se ne mogu detektovati test trakama ili metodama za određivanje ukupnih proteina u urinu. Nivoi mikroalbumina se određuju na aparatu Olympus AU 400. Urin se centrifugira 10 minuta na >800 obrtaja u minuti. Uzorak urina je stabilan šest meseci na -20°C.

Najmanja količina uzorka za analizu uključujući ukupni volume je 210 µL. Pojedinačan uzorak to jest količina urina potrebna za jednu analizu je 10 µL. Nivoi mikroalbumina se određuju imunoturbidimetrijskim testom. Merno područje je 5-300mg/L. senzitivnost je 0.46 mg/L. Merni interval je 5-300mg/L. Merenja se mogu ponavljati u okviru maksimalnog roka važnosti uzorka.

α_1 -mikroglobulin (α_1 -M)

Analiza se vrši na aparatu Olympus AU 400. Za analizu se koristi uzorak urina koji se centrifugira na 800 g. Uzorak je postojan 7 dana na temperature – (2-8)⁰C. Najmanja količina urina uključujući volume 315µL, a za pojedinačnu analizu se koristi uzorak od 15µL. Mikroalbumin se kvantitativno određuje imunoturbidimetrijskim testom: merni interval je 2-200 mg/L.

β_2 -mikroglobulin (β_2 -M)

Koristi se kao značajan test za procenu tubulske funkcije. Najjednostavniji materijal za analizu je urin ili uzorak iz 24 satne kolekcije urina ili pojedinačni ispražnjeni uzorak. Urine se centrifugira a najmanja količina uzorka za analizu je 182 µL, uključujući ukupan volumen. Pojedinačan uzorak za jednu analizu je 2 µL. Nivo se određuje imunoturbidimetrijski: merni interval je od 0.5-16.0 mg/L.

Tabela 6. Prikaz broja ispitanika u svim vremenskim tačkama, kod kojih su određeni novi biomarkeri: u AKI/AKIN1/AKIN2 grupama

Vreme	Biomarkeri (n-broj novorođenčadi)					
	NGAL krv	NGAL urin	Cys-C krv	KIM1 urin	Alfa-1 urin	Beta-2 urin
2h	103	32	106	17	18	42
4h	108	103	108	106	108	42
6h	106	83	106	52	108	108
3 dana	107	106	107	105	108	108
7 dana	107	106	107	104	102	106

Broj ispitivane novorođenčadi nije uvek bio maksimalan, jer kliničke okolnosti to nisu dozvoljavale, nekada slučajan gubitak dobijenog biološkog materijala za analizu, kontaminacija krvlju ili stolicom, nekada nemogućnost uzimanja uzorka, nekada isključivanje novorođenčeta iz studije i u malom broju slučajeva smrtni ishod ispitanika. Posebne teškoće odnose se na sakupljanje urina, najteže izvodljivo u prvom danu života, zbog poznatih problema u prvom uriniranju, oskudnom, odloženom ili neuspostavljenom tokom prvih 24 sata. Zato je negde broj ispitivane novorođenčadi manji od 108.

3.2.1.7 Radiološka-radioizotopska ispitivanja

Svakom novorođenčetu u studiji je urađen ultrasonografski pregled bubrega i mokraćnih puteva i kompletan pregled abdomena. Svaki ispitanik iz studije je imao urađen ultrasonografski pregled srca i abdomena. U prvom danu hospitalizacije je obavezno urađen Rtg pulmo et cor.

3.3 Statistička analiza

Statistička analiza ima tri dela u kojima su analizirane:

1. Opšte karakteristike novorođenčadi
2. Pojedinačni biomarkeri u svakom od vremena merenja u odnosu na AKI/AKIN i njihova promena u vremenu
3. Svi biomarkeri mereni u istom vremenu i njihova razlika u odnosu na AKI/AKIN

1. Opšte karakteristike novorođenčadi uključivale su: njihov pol, gestaciju, Apgar skor, bazni deficit (BD), telesnu masu na rođenju i njenu promenu tokom perioda praćenja, to jest aktuelnu telesnu masu (ATM), dužinu boravka u NICU, dužinu mehaničke ventilacije (MV). Kvalitativne varijable, odnosno varijable prikazane kategorijama, prikazane su učestalostima to jest frekvencijama i procentima. Kvantitativne varijable prikazane su aritmetičkim sredinama i standardnim devijacijama. ANOVA: značajnost razlika između AKI i AKIN klasifikacija i drugih kategorijalnih varijabli ispitivana je Hi-kvadrat testom (χ^2) a njihova razlika u odnosu na kvantitativne varijable Studentovim t-testom (za AKI) i jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa višestrukim testovima poređenja, kada je u pitanju AKIN klasifikacija. Povezanost između svih opštih karakteristika ispitivana je Spirmanovim koeficijentom korelacije rangova sa ciljem da se početni skup opštih karakteristika smanji koliko god je to moguće.

2. Pojedinačni biomarkeri: U ovom delu pre svega je ispitivana normalnost raspodele vrednosti novih biomarkera (uNGAL, sNGAL, KIM1, α_1 -mikroglobulina, β_2 -mikroglobulina) Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Vrednosti koje nisu sledile normalnu raspodelu transformisane su pomoću logaritamske tranformacije (ln). Prikazani su kao aritmetičke sredina sa odgovarajućim standardnim devijacijama. Transformisani podaci su za potrebe deskripcije

antilogaritmovani dok su istovremeno sve analize rađene sa tim-tranformisanim varijablama, zvane Vertikalne analize. Zatim je ispitivana značajnost razlike svakog pojedinačnog novog biomarkera u svakom merenju u odnosu na AKI/AKIN Studentovim t-testom za (AKI) ili jednofaktorskom Fišerovom analizom varijanse sa višestrukim testovima poređenja po Bonferoniju za (AKIN) u koju su ušla sva deca bez obzira na broj podataka. Rezultati su i tabelarno i grafički prikazani.

Korelacije: Povezanost između vrednosti istog biomarkera merenog u različitim vremenima izračunata je pomoću Pirsonovog koeficijenta linearne korelacije, zvane Vertikalne analize.

ROC analizom: je ispitivana prediktivna sposobnost vrednosti NGAL u krvi iz različitih vremena merenja da identifikuje one sa AKI. Ta sposobnost iskazuje se površinom ispod ROC krive, to jest veličinom AUC (area under the curve), njenim 95% intervalom poverenja i značajnošću p. Data je i optimalna vrednost praga (treshold, cut-off point) za predviđanje pripadništva AKI. Pored tabelarnih ima i grafički prikaz. Na kraju je i poređenje ROC krivih između sebe. Isto kao prethodno ali za AKIN, zvana Vertikalna analiza). Prirodan zahtev je ne analizirati samo pojedinačna vremena za svaki biomarker i njihove razlike u odnosu na AKI/AKIN nego možda još i važnije je analizirati dinamiku promene svakog biomarkera s jedne i ispitati da li je ta promena ista ili značajno različita u različitim AKI kategorijama. Da bi dobili odgovor na ova pitanja primenjena je Fišerova jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima. Kako te razlike mogu biti kreirane i zbog različitih opštih karakteristika novorođenčadi ova analiza je prilagođena (ađastirana) na pol, GES i AS pomoću jednofaktorske analize kovarijanse (ANCOVA) sa ponovljenim merenjima. Razlog zašto je prilagođavanje urađeno samo na pol, GES i AS vidi se u izračunatim Pirsonovim korelacijama gde su sve ostale opšte karakteristike visoko značajno povezane za ove, zvana Vertikalna analiza. Postoji i tabelarni i grafički prikaz. U ovoj analizi nisu rađena sva vremena svih biomarkera nego samo ona koja imaju dovoljno podataka.

3.Svi biomarkeri: U poslednjem delu analizirani su svi biomarkeri koji su mereni u istom vremenu, odnosno, njihova prediktivna / klasifikaciona sposobnost da ispravno predvide ili klasifikuju dete u jedno od AKI/AKIN kategorija. Najpre su urađene univarijantne a zatim multivarijantne logističke regresione analize sa AKI / AKIN kao zavisnom varijablom a različitim biomarkerima (uvek kao skorovi logaritmovane ili obične vrednosti - razlog ovome je

što su vrednosti biomarkera kvantitativne pa se najčešće tumače kao promena zavisne za promenu 1 standardne nezavisne promenljive: 1 SD) merenim u istom vremenu kao nezavisnim varijablama u univarijantnim modelima a multivarijanti - samo pol, GES i AS a potom dodat biomarker. Tačnost svakog od takvih logističkih regresionih modela ispitivana je diskriminacionom [c - vrednosti AUC na osnovu predicted probabilities iz logističkih regresionih modela i kalibracionom metodom (-2 log. likelihood)]. U ovoj analizi nisu rađena sva vremena svih biomarkera nego samo ona koja imaju dovoljno podataka, Horizontalna analiza. Ista analiza je urađena za četvrti sat ali uz sledeći dodatak: biomarkeri mereni u vremenima 2, 4 i 6 sati su potencijalni prediktori AKI (AKI je dobijen tako da su se sabrali događaji zaključno sa trećim danom). Dakle, uz ono što je isto kao i za 2 sata i 4 sata ima i četiri multivarijantna regresiona modela koja uključuju kao nezavisne varijable: sve biomarkere, sve biomarkere i pol, GES, AS, i isto to sa skorovima biomarkera i adžastera. Ista analiza je izvedena za šesti sat ali uz sledeći dodatak: biomarkeri mereni u vremenima 2, 4 i 6 sati su potencijalni prediktori AKI, (AKI je dobijen tako da su se sabrali događaji zaključno sa trećim danom). Dakle, uz ono što je isto kao i za 2 sata i 4 sata ima i četiri multivarijantna regresiona modela koja uključuju kao nezavisne varijable: sve biomarkere, sve biomarkere i pol, GES, AS, i isto to sa skorovima biomarkera i adžastera. Ista analiza je izvedena za treći dan takodje sa dodatkom. Ali u ovom slučaju nije reč o predviđanju vrednosti AKI nego koliko dobro vrednosti biomarkera klasifikuju u već poznato stanje to jest poznatu kategoriju AKI. Ista analiza je izvedena za sedmi dan (DAN7) uz istu ogradu kao i kada je reč o trećem danu (DAN3) .

Analiza je rađena uz korišćenje statističkog paketa programa SPSS ver 20, a statistička značajnost definisana je verovatnoćom nulte hipoteze manje ili jednako 0.05. (Statistical analysis was performed using SPSS for ver. 20. $p < 0.05$ was considered to be statistically significant).

4. REZULTATI

Opsežno istraživanje akutnog oštećenja bubrega novorođenčeta (AOB) obuhvatilo je veliki uzorak od 108 preterminske novorođenčadi, koji su svi imali neki od oblika perinatalne asfiksije i bili u riziku za razvoj AKI. Rekrutovani su u dužem vremenskom periodu ispunivši stroge, protokolom predviđene kriterijume ulaska u studiju. Figura 1.

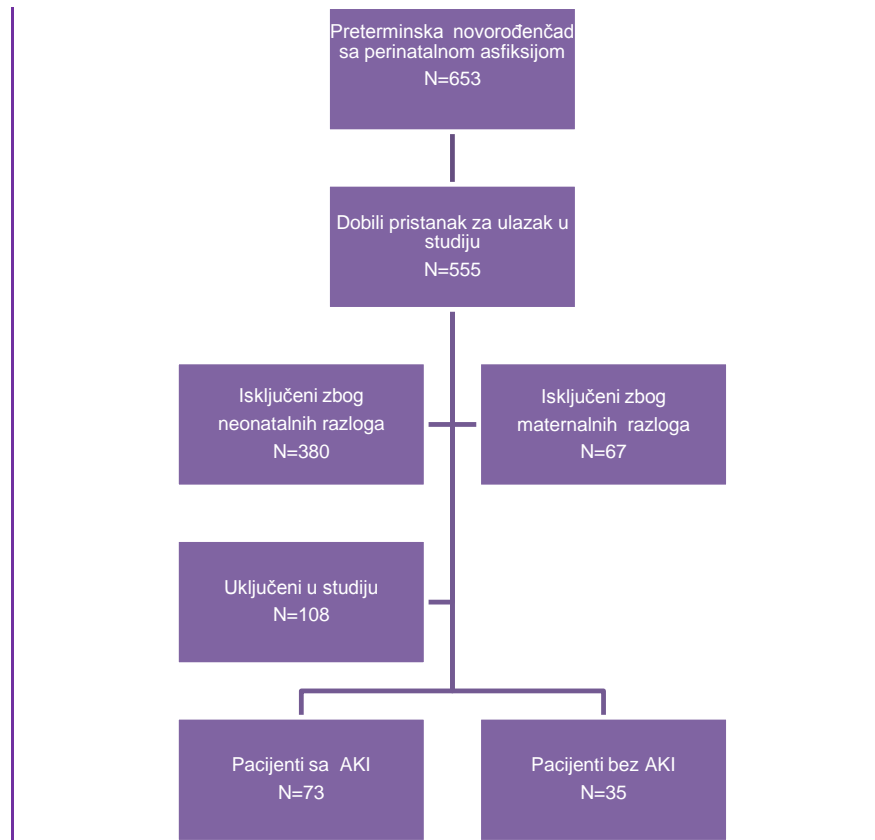


Figura 1. Dijagram regrutovanja pacijenata u ispitivanje.

Prema razvoju AKI u sklopu perinatalne asfiksije, svi ispitanici su podeljeni u dve grupe: AKI grupu, veću grupu novorođenčadi koji su razvi AKI 73 (67.6%) i non-AKI grupu, manju grupu novorođenčadi bez AKI 35 (32.4%).

Tabela 7. Osnovne kliničke karakteristike ispitivane novorođenčadi

Karakteristike	Ukupno n=108	Ne-AKI n=35(32.4%)	AKI n=73(67.6%)	P	AKIN1 n=61(83.6%)	AKIN2 n=12(16.4%)	P
Muški, n (%)	66 (61.1)	22 (33.0)	44 (66.0)	ns	25 (86.2)	4 (13.8)	ns
Gestacija, nedelje	33.9 ± 2.0	34.4 ± 1.7	33.6 ± 2.0	ns	33.5 ± 2.1	34.0 ± 1.9	ns
Porodajna telesna masa, g	2214 ± 551	2195 ± 551	2263 ± 581	ns	2204 ± 535	2322 ± 627	ns
Telesna masa, g DAN1	2205 ± 545	2185 ± 540	2257 ± 579	ns	2194 ± 534	2321 ± 625	ns
Telesna masa, g DAN3	2166 ± 545	2157 ± 542	2200 ± 582	ns	2152 ± 533	2249 ± 631	ns
Telesna masa, g DAN7	2131 ± 552	2135 ± 557	2140 ± 588	ns	2115 ± 528	2166 ± 648	ns
Apgar skor, 5min	5.00 ± 1.62	5.05 ± 1.51	4.79 ± 1.63	0.043	5.09 ± 1.64	4.50 ± 2.02	ns
Bazni deficit, BD (mmol/l)	8.57 ± 3.09	7.76 ± 2.50	9.03 ± 3.25	0.016	8.48 ± 3.15	11.61 ± 2.93	0.001
Diureza: D (ml/kg/h)	2.51 ± 1.24	2.66 ± 1.26	2.31 ± 1.30	ns	2.38 ± 1.14	2.25 ± 1.47	ns
Basalni serum Kreatinin DAN1 (µmol/l)	108.4 ± 27.2	115.2 ± 28.8	98.7 ± 16.1	0.001	105.4 ± 27.4	98.20 ± 13.7	0.001
Serum Kreatinin DAN3 (µmol/l)	150.4 ± 45.5	118.2 ± 30.6	189.1 ± 38.7	<0.000	160.0 ± 31.7	218.2 ± 42.3	<0.001
Serum Kreatinin DAN7 (µmol/l)	126.8 ± 36.8	104.7 ± 26.8	149.0 ± 35.4	<0.000	137.0 ± 33.9	159.0 ± 36.3	<0.001
Basalni eCCL (ml/min/1.73m ²)	12.71 ± 2.99	11.81 ± 3.08	13.58 ± 2.37	0.001	13.56 ± 2.88	13.61 ± 1.86	0.008
DAN3 eCCL (ml/min/1.73m ²)	9.51 ± 3.12	11.18 ± 3.34	7.81 ± 1.51	<0.001	8.43 ± 1.66	6.21 ± 1.14	<0.001
DAN7 eCCL (ml/min/1.73m ²)	11.19 ± 3.37	12.76 ± 3.38	9.30 ± 2.33	<0.001	9.95 ± 2.68	8.66 ± 1.98	<0.001
HIE, (%)	41 (38.0)	6 (14.6)	35 (85.3)	<0.001	25(61.0)	10 (24.4)	<0.001
Dužina hospitalizacije	10.35 ± 6.81	6.81 ± 4.30	12.29 ± 7.08	<0.001	12.15 ± 6.88	15.00 ± 8.13	<0.001
Mehanička ventilacija, dani	6.89 ± 5.87	4.56 ± 4.47	11.37 ± 5.89	<0.001	7.14 ± 3.92	15.61 ± 7.87	<0.001
Ppreživeli u 10 dana %	107 (98.16)	35 (100)	71 (97.26)	ns	61(100%)	10(83.33%)	<0.001

DAN=dan života; eCCL: procenjeni kreatinin klirens, HIE: hipoksijsko-ishemijska encefalopatija

4.1. Analiza rezultata ispitivanja pojave AKI u preterminske novorođenčadi sa APN

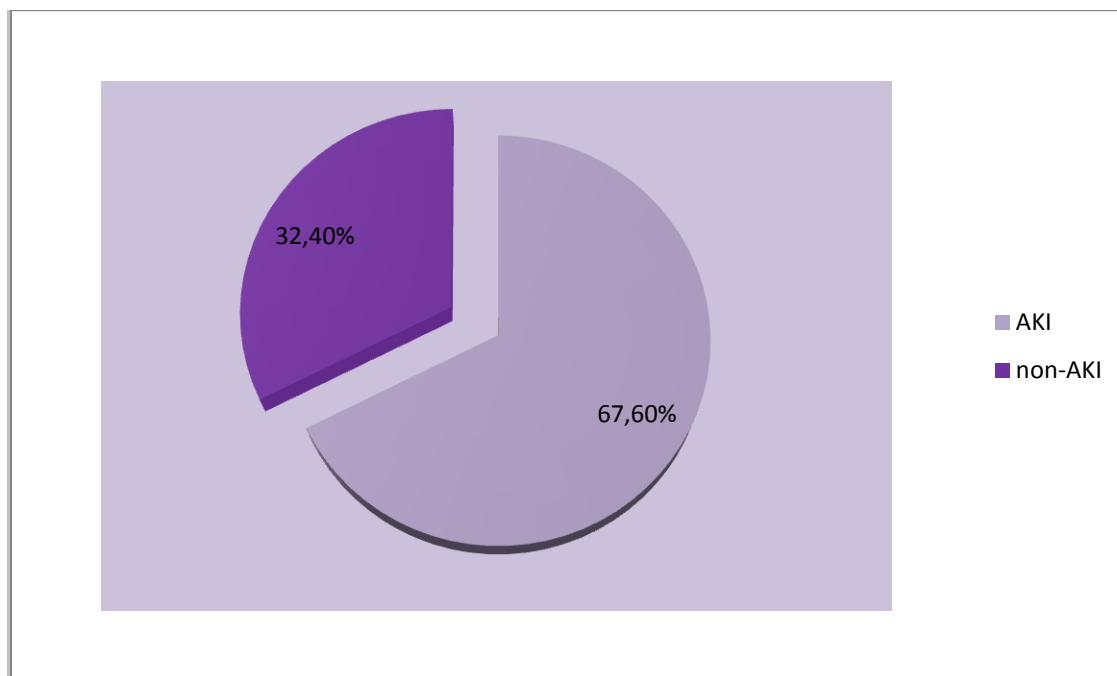


Figura 2a. Distribucija ispitanika grupama po ne-AKI/AKI klasifikaciji

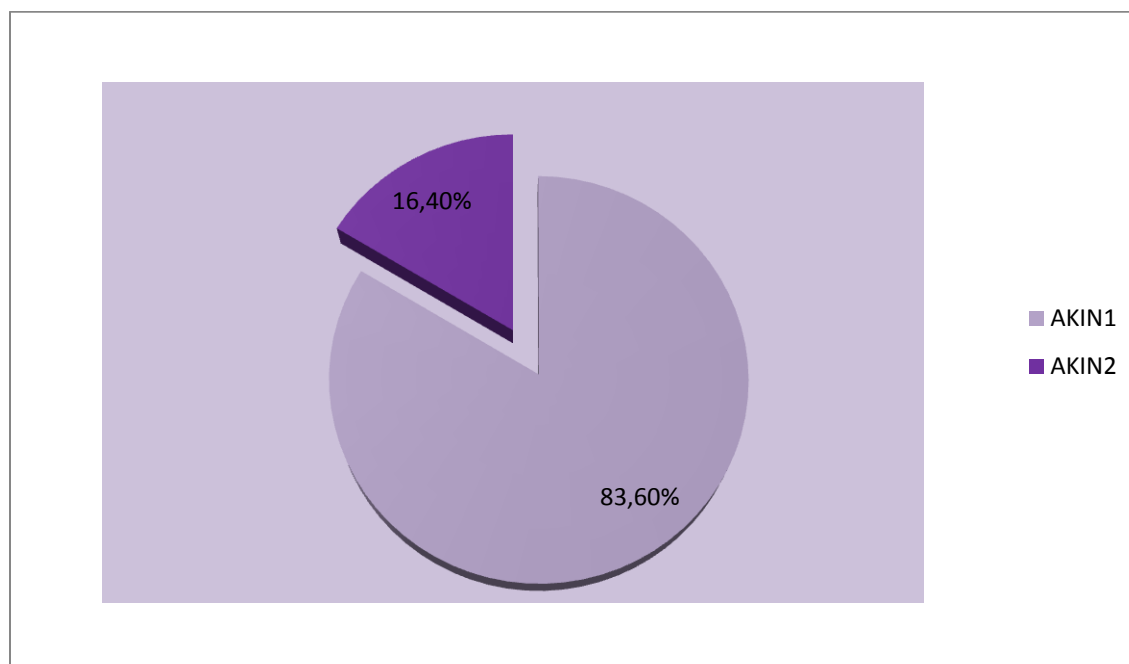


Figura 2b. Distribucija ispitanika po podgrupama po AKIN klasifikaciji

4.1.1. Vrednosti novih biomarkera (sNGAL, uNGAL, KIM-1)

4.1.1.2. Serumski NGAL (sNGAL)

Table 8. a sNGAL (ng/ml) u preterminske novorođenčadi u ne-AKI/AKI/AKIN grupama; (metrički sistem)

sNGAL	ne-AKI	AKI	p	AKIN ₁	AKIN ₂	p
DAN₁₂, 2h -n; mean±SD	32 78.80 ± 72.43	71 147.43 ± 102.44	0.000	59 143.89 ± 103.82	12 167.36 ± 97.20	0.239
DAN₁₄, 4h -n; mean±SD	35 87.10 ± 81.64	73 160.76 ± 113.10	0.000	61 147.79 ± 109.87	12 222.83 ± 112.90	0.026
DAN₁₆, 6h -n; mean±SD	34 102.88 ± 91.58	72 153.68 ± 105.76	0.003	61 146.08 ± 102.61	11 195.82 ± 118.04	0.129
DAN₃, -n; mean±SD	35 105.30 ± 106.02	72 125.19 ± 80.71	0.059	60 119.0 ± 79.46	12 151.95 ± 85.15	0.123
DAN₇, -n; mean±SD	35 88.85 ± 84.28	72 100.31 ± 65.76	0.147	60 94.39 ± 62.89	12 129.91 ± 74.49	0.068

DAN=dan života, AKI: Acute kidney injury, ne-AKI: bez AKI, sNGAL: serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (ng/ml), AKIN klasifikacija: Acute Kidney Injury Network; AKIN1: Stepen1 po AKIN klasifikaciji; AKIN2: Stepen 2 po AKIN klasifikaciji,

Table 8. b sNGAL (mmol/L) u preterminske novorođenčadi u ne-AKI/AKI/AKIN grupama; (SI sistem)

sNGAL	ne-AKI	AKI	p	AKIN ₁	AKIN ₂	p
DAN₁₂, 2h -n; mean±SD	32 3.15 ±2.90	71 5.90 ± 4.10	0.000	59 5.76 ± 4.15	12 6.69 ±3.89	0.000
DAN₁₄, 4h -n; mean±SD	35 3.48 ±3.27	73 6.43 ± 4.52	0.000	61 5.91 ±4.39	12 8.91 ± 4.52	0.000
DAN₁₆, 6h -n; mean±SD	34 4.12 ± 3.66	72 6.15± 4.23	0.003	61 5.84 ± 4.10	11 7.83 ±4.72	0.004
DAN₃ -n; mean±SD	35 4.21 ± 4.24	72 5.0 ± 3.23	0.059	60 4.76 ±3.18	12 6.10 ±3.41	0.057
DAN₇ -n; mean±SD	35 3.55 ±3.37	72 4.01 ±2.63	0.147	60 3.78 ±2.52	12 5.20 ± 2.98	0.075

DAN=dan života, AKI: Acute kidney injury, ne-AKI: bez AKI, sNGAL: serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (mmol/L), AKIN klasifikacija: Acute Kidney Injury Network; AKIN1: Stepen1 u AKIN klasifikaciji; AKIN2: Stepen2 u AKIN klasifikaciji,

•Analiza vrednosti sNGAL u svih pet tačaka merenja

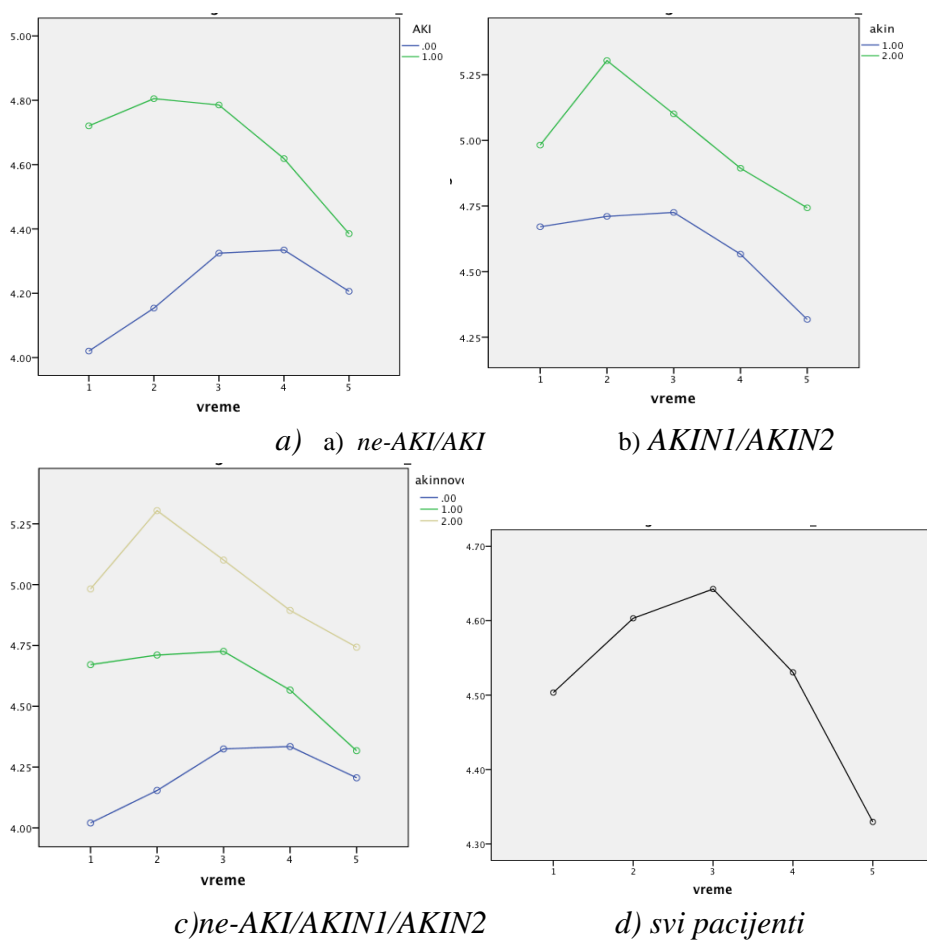


Figura 3 (a,b,c,d): Promena sNGAL u pet tačaka ispitivanja po grupama

ne-AKI/ AKIN1/ AKIN2

•Analiza vrednosti sNGAL u četiri tačke merenja

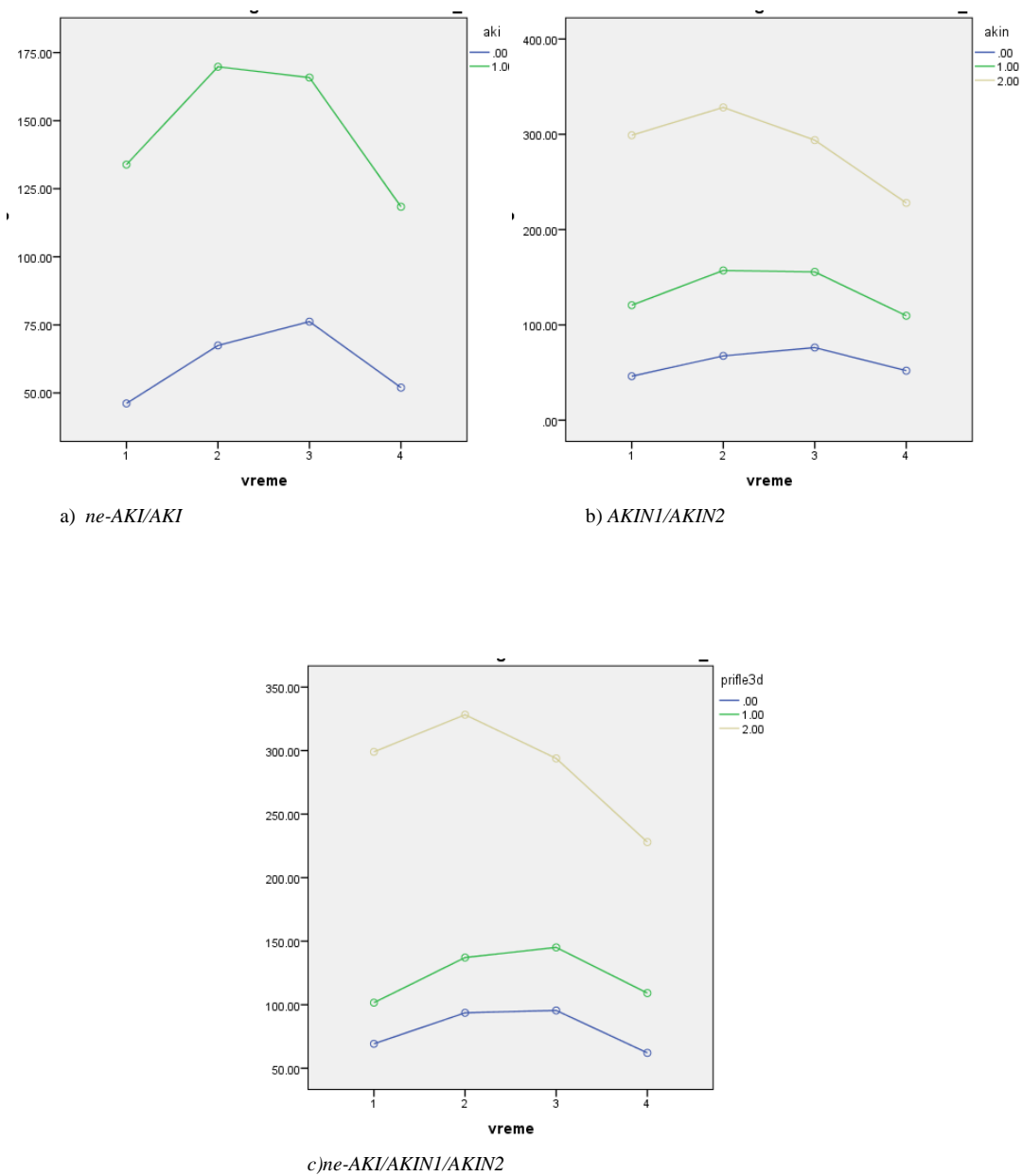


Figura 4. Promene vrednosti serum NGAL (sNGAL) u četiri tačke merenja po grupama ne-AKI/AKIN1/AKIN2

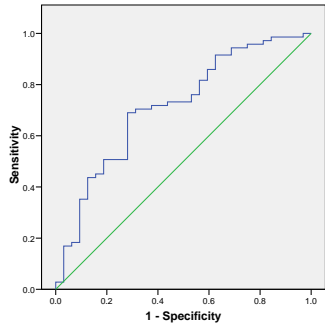
Tabela 9. Dijagnostičke karakteristike serum NGAL kao biomarkera akutnog oštećenja bubrega po AKIN klasifikaciji u svim vremenima

	BIOMARKE RI Predictorske variable	n	AUC	95% CI	p	Optimalne cut-off vrednosti	Senzitivnost (%) (95%CI)	Specifičnost (%) (95%CI)	LR+ (95%CI)	LR- (95%CI)
ne-AKI vs. AKI	s NGAL, DAN ₁₂	103	0.72 [*]	0.62 - 0.80	0.000	84.87	69.00 (56.9-79.5)	71.90 (53.3-86.3)	2.45 (1.9-3.2)	0.43 (0.2-0.8)
	s NGAL, DAN ₁₄	108	0.72 [*]	0.63 - 0.80	0.000	89.43	65.75 (53.7-76.5)	74.29 (56.7-87.5)	2.56 (2.0-3.3)	0.46 (0.2-0.9)
	s NGAL, DAN ₁₆	106	0.68	0.58 - 0.76	0.001	54.21	88.90 (79.3-95.1)	44.10 (27.2-62.1)	1.59 (1.1-2.3)	0.25 (0.1-0.5)
	s NGAL, DAN ₃	107	0.63	0.53 - 0.72	0.024	106.50	45.83 (34.0-58.0)	82.86 (66.4-93.4)	2.67 (2.0-3.6)	0.65 (0.3-1.4)
	s NGAL, DAN ₇	107	0.59	0.49 - 0.69	0.060	38.20	88.89 (79.3-95.1)	34.29 (19.2-52.2)	1.35 (0.8-2.2)	0.32 (0.2-0.6)
ne-AKI vs. AKIN 1	s NGAL, DAN ₁₂	91	0.70	0.59 - 0.81	0.000	84.9	64.41 (34.9-90.1)	71.87 (57.9-83.6)	2.29 (0.7-8.7)	0.50 (0.03-1.2)
	s NGAL, DAN ₁₄	96	0.69	0.58 - 0.80	0.000	89.4	60.66 (34.9-90.1)	74.29 (62.7-85.5)	2.36 (1.3-4.2)	0.53 (0.2-1.2)
	s NGAL, DAN ₁₆	95	0.66	0.54 - 0.78	0.017	54.2	86.89 (48.2-97.7)	74.12 (39.0-94.0)	2.55 (0.9-6.3)	0.50 (0.1-1.8)
	s NGAL, DAN ₃	95	0.60	0.48 - 0.72	0.051	100.5	43.33 (15.2-72.3)	82.86 (69.6-90.5)	2.53 (0.7-8.9)	0.68 (0.3-1.6)
	sNGAL, DAN ₇	95	0.56	0.44 - 0.69	0.156	38.2	86.67 (51.6-97.9)	34.29 (23.1-48.4)	1.32 (0.9-2.0)	0.59 (0.2-1.6)
AKIN1 vs. AKIN 2	s NGAL, DAN ₁₂	71	0.61	0.49 - 0.73	0.138	88.0	91.67 (61.5-97.9)	45.76 (33.7-60.0)	1.69 (1.1-2.5)	0.18 (0.03-1.2)
	sNGAL, DAN ₁₄	73	0.72 [*]	0.60 - 0.82	0.001	102.7	91.67 (61.5-97.9)	54.10 (41.6-67.9)	2.00 (0.6-7.1)	0.15 (0.02-1.0)
	s NGAL, DAN ₁₆	72	0.65	0.53 - 0.76	0.073	64.9	100.0 (73.5-100.0)	26.20 (15.8-39.1)	1.36 (0.9-2.1)	0.00
	s NGAL, DAN ₃	72	0.64	0.51 - 0.75	0.061	69.9	100.0 (73.5-100.0)	33.30 (21.3-46.0)	1.50 (1.1-2.2)	0.00
	s NGAL, DAN ₇	72	0.65	0.53 - 0.76	0.055	91.0	75.00 (42.8-94.5)	60.00 (47.3-72.9)	1.87 (1.1-3.1)	0.42 (0.2-1.2)

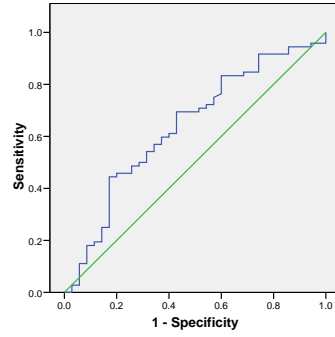
sNGAL:serum NGAL(ng/ml)-serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin concentration; AKI-Acute kidney injury ;ne-AKI-bez AKI; AKIN1-Stepen 1 AKI ;AKIN2- Stepen 2 AKI ; DAN:dan života; DAN₁₂-2 sat po prijemu u DAN1; DAN₁₄-4 sat po prijemu u DAN1; DAN₁₆-6 sat po prijemu u DAN1; DAN₃-Treći dan života ;DAN₇-Sedmi dan života; CI- Interval poverenja; (LR+)- Likelihood ratio positive; (LH-) Likelihood ratio negative; AUC: area under the receiver-operating-characteristic curve.# According to Hanley-McNeil test.

ROC analizom je ispitivana prediktivna sposobnost vrednosti NGAL u krvi (sNGAL) iz različitih vremena merenja, da identifikuje one sa AKI. Ta sposobnost iskazana je veličinom površine ispod ROC krive to jest veličinom AUC i njenim 95% intervalom poverenja i značajnošću $p=0.05$. Data je i optimalna vrednost praga (cut-off point) za predviđanje pripadništva AKI, kao i senzitivnost i specifičnost. U AKI grupi najbolji AUC-ROC je imao sNGAL u DAN1₄ AUC=72[95%(0.62-0.80)] $p=0.000$. U AKIN2 grupi u DAN1₄ AUC-ROC je iznosio 72[95%(0.60-0.82)] $p=0.001$. Po klasifikaciji Mc Nail ova vrednost AUC-ROC pripada grupi dobar, razuman. Tabela 9.

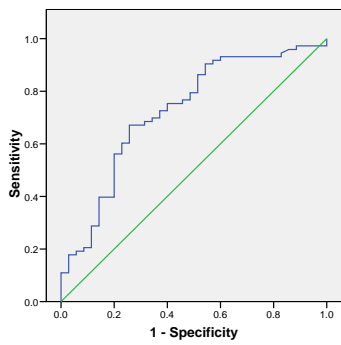
...



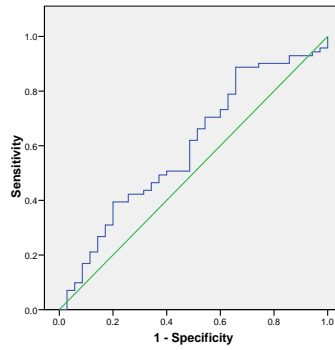
2h



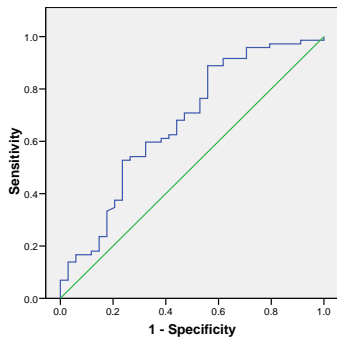
3 day



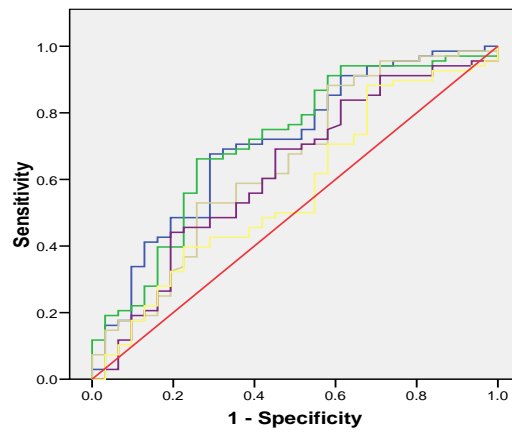
4h



7 day



6h



2h (-) 4d(-) 6h(-) 3day (-) 7day ()

Fig 1. ROC curves for s.NGAL (1₂, 1₄, 1₆, 3day, 7day, all)

REGRESIONA ANALIZA

•Prilagodavanje vrednosti sNGAL na pridružene varijable

Da bi se poboljšala prediktiva sposobnost sNGAL njegova vrednost iz svake tačke merenja je prilagođena (ađastirana) na pridružene varijable: pol, gestaciju, porođajnu telesnu masu i bazni eksces. Vrednosti AUC-ROC nakon ađastiranja u AKI grupi u svim tačkama merenja iznosile su:

AUC-ROC=0.80 [95%(0.70-0.89)] p<0.000: u AKI DAN₂

AUC-ROC=0.78 [95%(0.68-0.87)] p<0.000: u AKI DAN₄

AUC-ROC=0.77 [95%(0.68-0.86)] p<0.000: u AKI DAN₆

AUC-ROC=0.73 [95%(0.63-0.83)] p<0.000: u AKI DAN₃

AUC-ROC=0.70 [95%(0.59-0.80)] p<0.001: u AKI DAN₇

Serumski NGAL (sNGAL) je “ađastiranjem” na pridružene varijable značajno poboljšao prediktivnu sposobnost svog AUC-ROC. Između početnih [P] vrednosti, levo i ađastiranih [A] ,desno, razlika je bila statistički veoma značajna:

[P]	[A]	
0.72	0.80	p=0.000 u 2 času
0.72	0.78	p=0.000 u 4 času
0.68	0.77	p=0.000 u 6 času
0.63	0.73	p=0.000 u 3 danu
0.59	0.70	p=0.001 u 7 danu

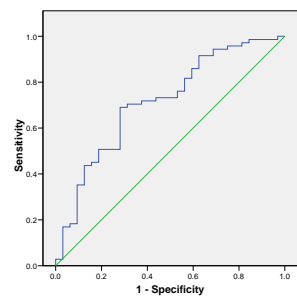
Najbolje prediktivne sposobnosti sNGAL zabeležene su u drugom i četvrtom satu prvoga dana ispitivanja. Na taj način sNGAL nudi značajnu prognostičku informaciju u ranim vremenskim tačkama. sNGAL se potvrđuje kao značajan prediktor AKI sam i kao veoma značajan nakon ađastiranja. Tabela 10 i Figura 6.

Tabela 10. Asocijacija između koncentracija sNGAL (nakon prilagođavanja na pridružene varijable) između 1 i 7 dana i razvoja AKI

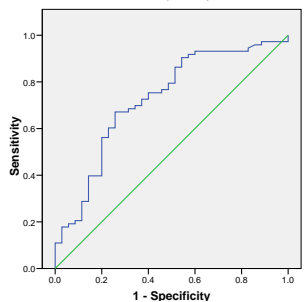
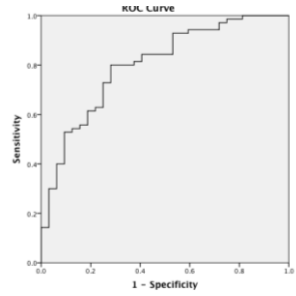
Zavisne varijable	sNGAL	Multivarijantni model#	
		OR	(95 % CI) P
AKI vs. ne-AKI	sNGAL DAN 1 ₂	1.185	(0.000-7.139) 0.999
	sNGAL DAN 1 ₄	1.012	(1.003-1.020) 0.007
	sNGAL DAN 1 ₆	1.009	(1.002-1.015) 0.010
	sNGAL DAN 3	1.006	(1.001-1.012) 0.030
	sNGAL DAN 7	1.007	(1.000-1.014) 0.046
AKIN2 vs. AKIN1	sNGAL DAN 1 ₂	1.003	(0.996-1.010) 0.384
	sNGAL DAN 1 ₄	1.005	(0.999-1.011) 0.117
	sNGAL DAN 1 ₆	0.005	(0.998-1.012) 0.194
	sNGAL DAN 3	1.006	(0.997-1.014) 0.191
	sNGAL DAN 7	1.010	(1.000-1.021) 0.055

sNGAL=serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels; AKI=Acute kidney injury; ne-AKI= bez AKI; AKIN1= Stepen 1 AKI; AKIN2= Stepen 2 AKI; DAN=dan života, DAN 1₂= 2 sat po prijemu u DAN1, DAN 1₄= 4 sat po prijemu u DAN1, DAN 1₆=6 sat po prijemu u DAN1; CI= Interval poverenja ; OR= odds ratio,odnos šansi; #^aAdjusted for (prilagođeni na): pol, gestaciju, 5-min Apgar skore, porođajnu telesnu masu, bazni deficit

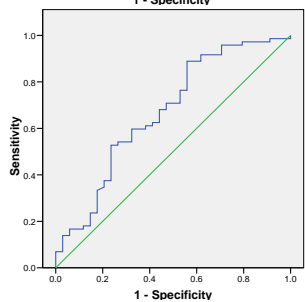
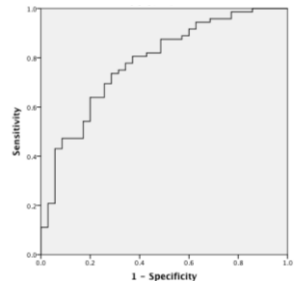
Dijagnostičke koncentracije sNGAL su faktor rizika za razvoj AKI, što je takođe potvrdila multivarijantna logistička regresiona analiza, koja pokazuje da sve veći rizik za AKI raste sa povećanjem koncentracije (sNGAL u DAN1, DAN3, DAN7), nakon ađastiranja na pridružene varijable. (Tabela 10).



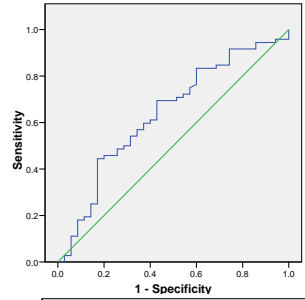
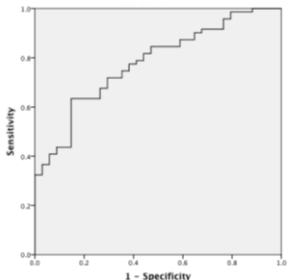
2h



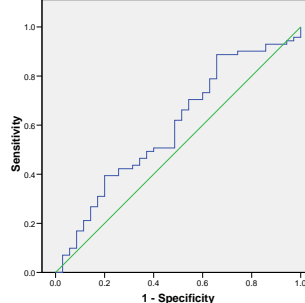
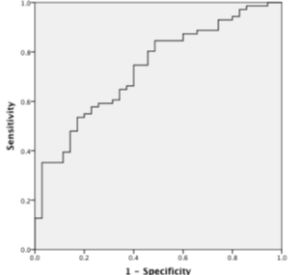
4h



6h



3dan



7dan

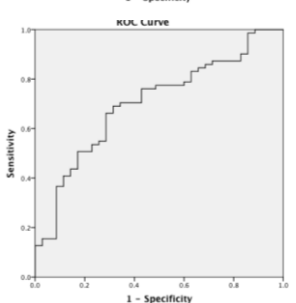


Fig 6. ROC krive za s.NGAL (I_2 , I_4 , I_6 , 3dan, 7dan) pre (levo) i posle prilagođavanja (desno)

4.1.1.3. Urinarni NGAL (uNGAL)

U ovom delu prikazujemo uNGAL.

Tabela 11a. uNGAL: standardizovane vrednosti (ng/mg/uCr) i apsolutne vrednosti (ng/ml) u preterminske novorođenčadi u ne-AKI/ AKIN1 / AKIN2 grupi (metrički sistem)

uNGAL	Vreme Merenja-n	ne-AKI	AKI	p	AKIN ₁	AKIN ₂	p
STANDARDIZED Vrednosti (ng/mg uCr)	DAN₁₂ -n; mean±SD	3 24.90±29.16	14 83.00 ±53.06	0.043	11 92.13 ±50.89	3 49.53 ± 56.63	0.068
	DAN₁₄ -n; mean±SD	40 52.40± 46.43	58 112.76 ± 112.3	0.001	49 114.3 ± 110.0	9 104.1 ±131.1	0.005
	DAN₁₆ -n; mean±SD	32 31.53± 36.24	30 163.9 ±161.9	0.016	27 156.9 ±156. 7	3 226.3 ±232.9	0.047
	DAN₃ -n; mean±SD	4 1 72.66±61.20	59 123.98±132.7	0.048	49 129.0±136.5	10 98.9 ± 115.4	0.137
	DAN₇ -n; mean±SD	42 51.57 ± 43.51	63 21.87 ±21.63	0.151	51 83.00 ±87.29	12 74.16 ±94.67	0.291
APSOLUTNE Vrednosti (ng/ml)	DAN₁₂ -n; mean±SD	3 25.90 ± 13.29	14 22.20 ± 17.22	0.546	11 22.59 ±18.18	3 19.66 ±13.10	0.814
	DAN₁₄ -n; mean±SD	40 28.13 ±3 1.01	58 33.89 ±32.96	0.360	49 32.96 ±29.35	9 40.65 ±54.90	0.872
	DAN₁₆ -n; mean±SD	32 31.53 ±36.24	30 38.98 ±40.12	0.764	27 36.12 ±39.70	3 62.60 ± 40.84	0.314
	DAN₃ -n; mean±SD	41 32.06 ± 28.97	59 31.69 ±30.44	0.988	49 31.77 ±30.64	10 31.22 ± 30.91	0.707
	DAN₇ -n; mean±SD	42 21.17 ± 17.40	63 21.81 ±21.63	0.594	51 21.27 ± 20.84	12 24.78±26.47	0.632

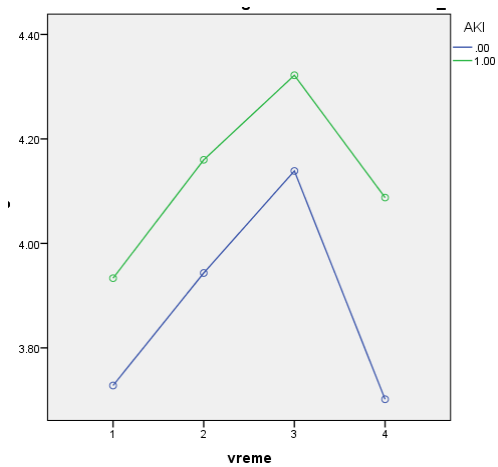
Legenda: DAN: dan života, AKI: acute kidney injury ; ne-AKI: nisu razvili AKI; uNGAL: urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin AKIN klasifikacija: Acute Kidney Injury Network; AKIN1: Stepen 1 po AKIN klasifikaciji, AKIN2: Stepen 2 po AKIN klasifikaciji Standardizovane vrednosti: (ng/mg uCr); Apsolutne vrednosti: (ng/ml)

Tabela 11b. uNGAL: standardizovane vrednosti (nmol/mmol uCr) i apsolutne vrednosti (nmol/L) u preterminske novorođenčadi u ne-AKI/AKIN1 / AKIN2 grupi (SI system)

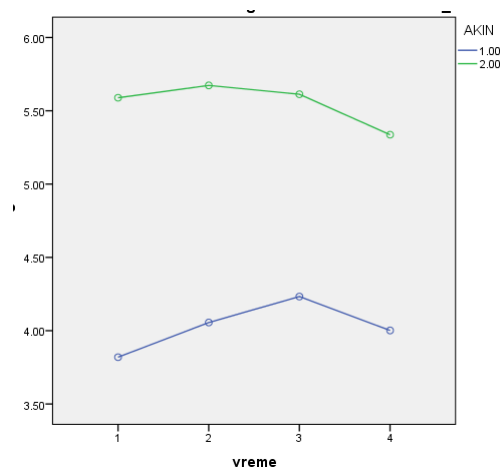
uNGAL	Vreme Merenja-n	ne-AKI	AKI	p	AKIN ₁	AKIN ₂	p
STANDARDIZED VALUES (nmol/mmol uCr)	DAN₁₂ -n; mean±SD	3 11.25 ± 13.18	14 37.51 ± 23.98	0.043	11 41.64 ± 23.00	3 22.38 ± 25.59	0.068
	DAN₁₄ -n; mean±SD	40 23.68± 20.99	58 50.96 ± 50.75	0.001	49 51.66 ± 49.72	9 47.05 ± 59.25	0.005
	DAN₁₆ -n; mean±SD	32 29.22± 35.30	30 74.08 ± 73.17	0.016	27 70.91 ± 70.82	3 102.29 ± 105.27	0.047
	DAN₃ -n; mean±SD	41 32.84±27.66	59 56.03±59.98	0.048	49 58.30±61.69	10 44.70 ± 52.26	0.137
	DAN₇ -n; mean±SD	42 23.30 ± 19.66	63 36.75 ± 39.78	0.151	51 37.51 ± 39.45	12 33.52 ±42.79	0.291
ABSOLUTE VALUES (nmol/L)	DAN₁₂ -n; mean±SD	3 1.03 ± 0.53	14 0.88 ± 0.68	0.546	11 0.90 ± 0.72	3 0.78 ± 0.52	0.814
	DAN₁₄ -n; mean±SD	40 1.12 ± 1.24	58 1.35 ± 1.31	0.360	49 1.31 ± 1.17	9 1.62 ± 2.19	0.872
	DAN₁₆ -n; mean±SD	32 1.26 ± 1.44	30 1.59 ± 1.60	0.764	27 1.44 ± 1.58	3 1.24 ± 1.23	0.314
	DAN₃ -n; mean±SD	41 1.28 ± 1.15	59 1.26 ± 1.21	0.988	49 1.27 ± 1.22	10 2.50 ± 1.63	0.707
	DAN₇ -n; mean±SD	42 0.84 ± 0.69	63 0.87 ± 0.86	0.594	51 0.85 ± 0.83	12 0.99±1.05	0.632

Legenda: DAN: dan života, AKI: acute kidney injury ; ne-AKI: nisu razvili AKI; uNGAL: urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalinAKIN klasifikacija: Acute Kidney Injury Network; AKIN1: Stepen 1 po AKIN klasifikaciji, AKIN2: Stepen 2 po AKIN klasifikaciji
Standardizovane vrednosti: (nmol/mmol uCr); Apsolutne vrednosti: (nmol/L)

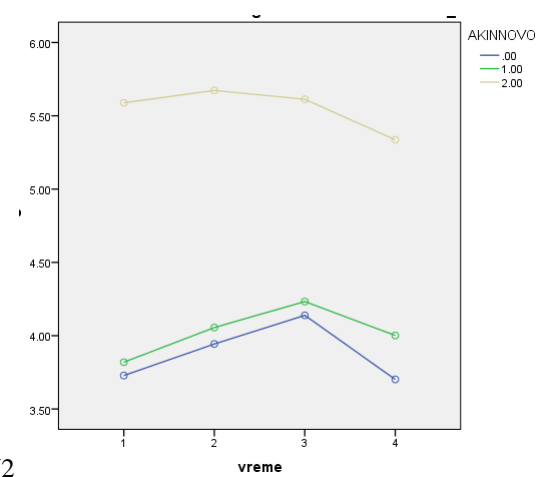
Pokazane su vrednosti uNGAL u dve osnovne grupe ispitanika u ne-AKI i AKI grupi i u podgrupama AKIN1 i AKIN2, Tabela 11(a,b) i Figura 9. Vrednosti uNGAL bile su značajno veće u AKI u odnosu na ne-AKI grupu u DAN₁₂, DAN₁₄, DAN₁₆ i DAN₃, kao i u AKIN2 u odnosu na AKIN1 u DAN₁₄ i DAN₁₆. Posmatrajući sve grupe u vremenu uočavamo da je dinamika promene vrednosti uNGAL bila značajna, kroz vreme ($F = 4.227$, $p < 0.05$), i istog tipa u svim grupama ($F = 0,662$, $p < 0.05$).



a) ne-AKI/AKI



b) AKIN1/AKIN2



c) ne-AKI/AKIN1/AKIN2

Figura 7. Promene vrednosti urinarnog NGAL (uNGAL) u četiri tačke merenja (DAN1₄, DAN1₆, DAN3 i DAN7) po grupama, ne-AKI/AKIN1/AKIN2, horizontalna analiza

Legend: a) 0.00---ne-AKI;---AKI b)1.00---AKIN1;---AKIN2 c)--- 0.00 ne- AKI; ----1.00 AKIN1; ----2.00AKIN2

Vreme: 1: DAN1₄ ; 2: DAN3; 3:DAN7; Vreme: 1: DAN1₄ ; 2: DAN3; 3:DAN7; Vreme: 1: DAN1₄ ; 2: DAN3; 3:DAN7;

a) Promena vrednosti uNGAL u četiri tačke merenja (DAN1₄, DAN1₆, DAN3 i DAN7); ne-AKI / AKI

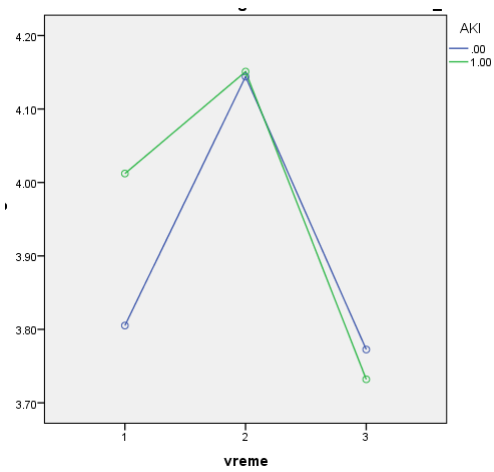
b) Promena vrednosti uNGAL u četiri tačke merenja (DAN1₄, DAN1₆, DAN3, i DAN7):

AKIN1/AKIN2

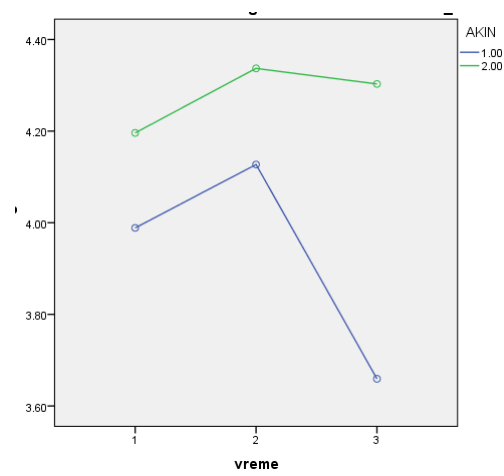
c) Promena vrednosti uNGAL u četiri tačke merenja (DAN1₄, DAN1₆, DAN3, DAN7)

ne-AKI/AKIN1/AKIN2

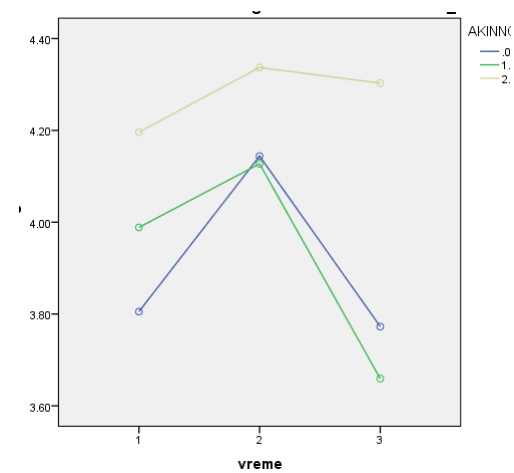
•Analiza vrednosti uNGAL u tri tačke merenja



a) ne-AKI/AKI



b) AKIN1/AKIN2



a) ne-AKI/AKIN1/AKIN2

Figura 8. Promene vrednosti urinarnog NGAL (uNGAL) u tri tačke merenja ($DAN1_4$, $DAN1_6$, $DAN3$) po grupama, ne-AKI/AKIN1/AKIN2, horizontalna analiza

Legend: a)--- 0.00 ne-AKI; --- 2.00 AKI ; b): --- 1.00 AKIN1; --- 2.00 AKIN2; c): ---0.00 ne-AKI; --- 1.00 AKIN1; ---2.00AKIN2

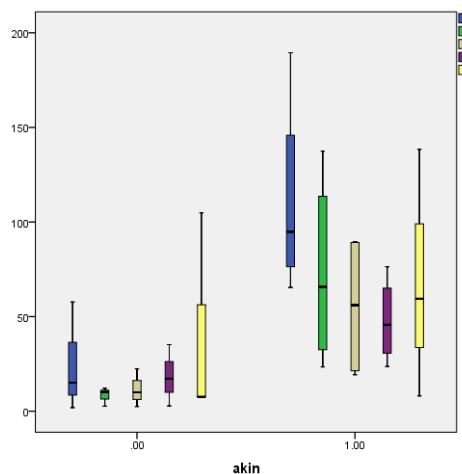
Vreme: 1: DAN1₄ ; 2: DAN3; 3:DAN7; Vreme: 1: DAN1₄ ; 2: DAN3; 3:DAN7; Vreme: 1: DAN1₄ ; 2: DAN3; 3:DAN7;

- a) Promena vrednosti uNGAL u tri tačke merenja (DAN1₄, DAN3, DAN7) u ne-AKI i AKI grupi
- b) Promena vrednosti uNGAL u tri tačke merenja (DAN1₄, DAN3, DAN7) u AKIN1 i AKIN2 grupi
- c) Promena vrednosti uNGAL u tri tačke merenja (DAN1, DAN3, DAN7) u ne-AKI, AKIN1 i AKIN2 grupi

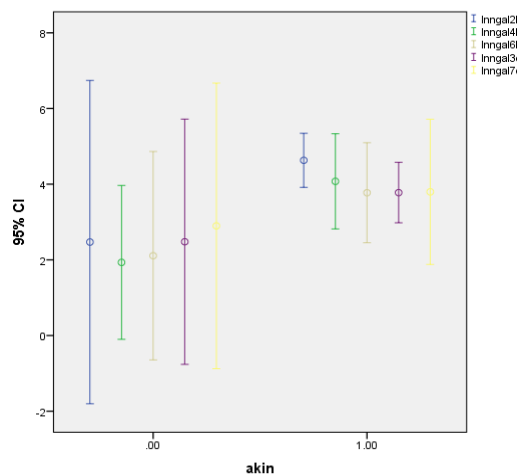
•Analiza vrednosti uNGAL u pet/četiri/tri tačke merenja, Vertikalna analiza

Prikazana na figuri 9.

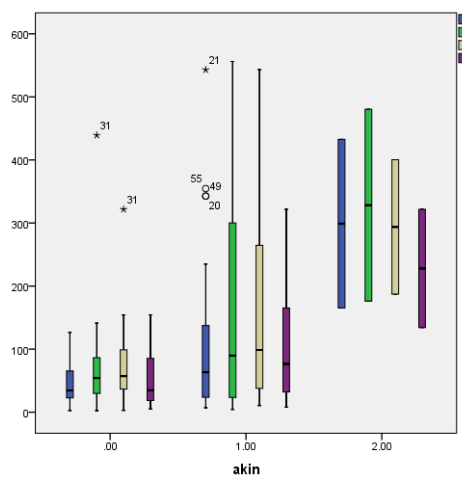
- a) Istovremeno u svih pet tačaka merenja ne-AKI/AKI
- b) Istovremeno u četiri tačke merenja neAKI/AKIN1/AKIN2
- c) Istovremeno u tri tačke merenja neAKI/AKIN1/AKIN2



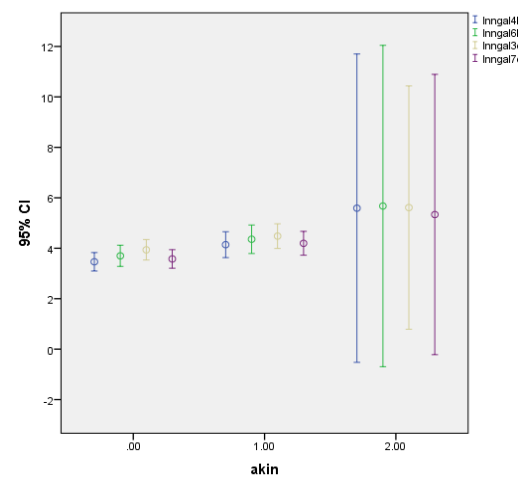
a) uNGAL u DAN1₂DAN1₄,DAN1₆,DAN3,DAN7;ne-AKI/AKI



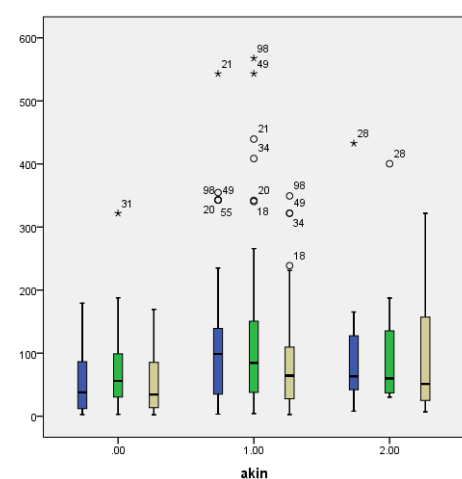
b) uNGAL u DAN1₂, DAN1₄,DAN1₆, DAN3,DAN7;ne-AKI/AKI



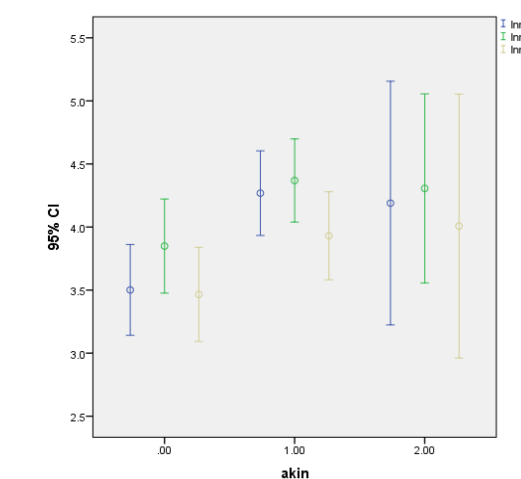
c) uNGALu DAN1₄,DAN1₆,DAN3,DAN7;ne-AKI/AKIN1/AKIN2



d) uNGALu DAN1₄,DAN1₆,DAN3,DAN7;ne-AKI/AKIN1/AKIN2



e)uNGALuDAN1₄,DAN3,DAN7ne-AKI/AKIN1/AKIN2



f)uNGAL uDAN1₄,DAN3,DAN7 u ne-AKI/AKIN1/AKIN2

Figura 9. Vrednosti uNGAL u pet, četiri i tri tačke merenja po grupama: ne-AKI/AKIN1/AKIN2

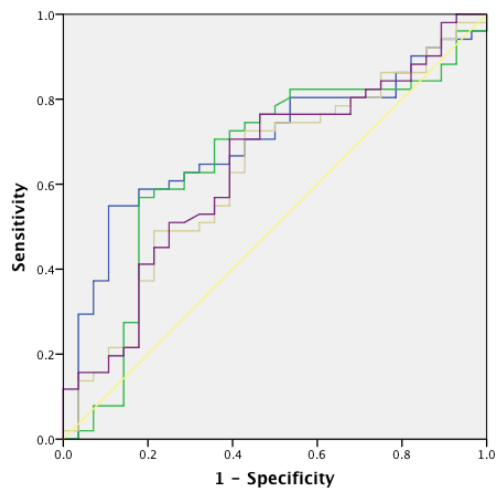
Tabela 12. Dijagnostičke karakteristike urinarnog NGAL kao biomarkera akutnog oštećenja bubrega po AKIN klasifikaciji u svim vremenima

	BIOMARKERS Predictor variables	n	AUC	95% CI	p	Optimal cutoff value	Sensitivity (%)	Specificity (%)	LR+	LR-
ne-AKI vs. AKI	u NGAL,DAN ₁₂	17	0.85	0.60 - 0.97	0.000	57.7	71.43	100.0		0.29
	u NGAL,DAN ₁₄	98	0.69	0.58 - 0.78	0.000	54.9	63.79	70.00	2.13	0.52
	u NGAL,DAN ₁₆	62	0.68	0.55 - 0.79	0.010	123.8	46.67	93.75	7.47	0.57
	u NGAL, DAN ₃	100	0.60	0.49 - 0.69	0.073	137.87	30.51	92.68	4.17	0.75
	u NGAL, DAN ₇	105	0.57	0.47 - 0.66	0.214	34.8	60.32	54.76	1.33	0.72
ne-AKI vs AKIN1	u NGAL,DAN ₁₂	14	0.90	0.63 - 0.99	0.000	57.7	81.82	100.00		0.18
	u NGAL,DAN ₁₄	89	0.69	0.59 - 0.79	0.000	54.9	65.31	70.70	2.18	0.50
	u NGAL,DAN ₁₆	59	0.69	0.54 - 0.84	0.016	66.4	66.67	71.87	2.37	0.46
	u NGAL, DAN ₃	90	0.61	0.50 - 0.71	0.051	137.8	32.65	92.68	4.46	0.73
	u NGAL, DAN ₇	93	0.58	0.47 - 0.68	0.156	34.80	62.75	54.76	1.39	0.68
AKIN1 vs AKIN 2	u NGAL,DAN ₁₂	14	0.69	0.40 - 0.90	0.387	26.00	66.67	90.91	7.33	0.37
	uNGAL, DAN ₁₄	58	0.57	0.43 - 0.70	0.510	89.57	77.78	53.06	1.66	0.42
	u NGAL,DAN ₁₆	30	0.61	0.42 - 0.78	0.596	136.6	66.67	66.67	2.00	0.50
	u NGAL, DAN ₃	59	0.57	0.43 - 0.70	0.429	59.86	70.00	61.22	1.81	0.49
	u NGAL, DAN ₇	63	0.58	0.45 - 0.70	0.408	25.6	50.00	76.47	2.12	0.65

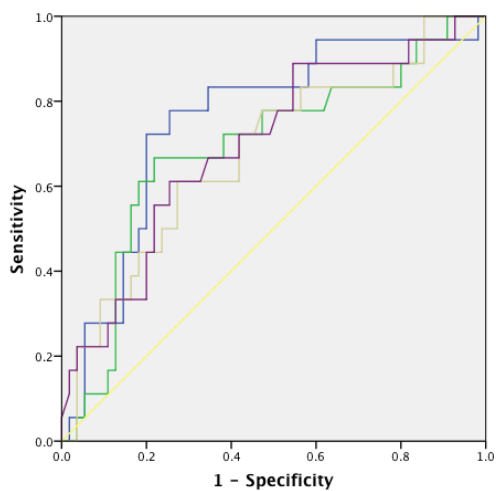
uNGAL: urinarni NGAL(ng/mg uCr); DAN:dan života; CI Interval poverenja; LR+ Likelihood ratio positive; LR-Likelihood ratio negative; AUC: area under the receiver-operating-characteristic curve

Vrlo dobar AUC-ROC za uNGAL je u AKI grupi ispitanika u DAN₁₂ i iznosi AUC=0.85[CI95%(0.60-0.97)] p=0.000. Tabela 12; Figura 10(a).

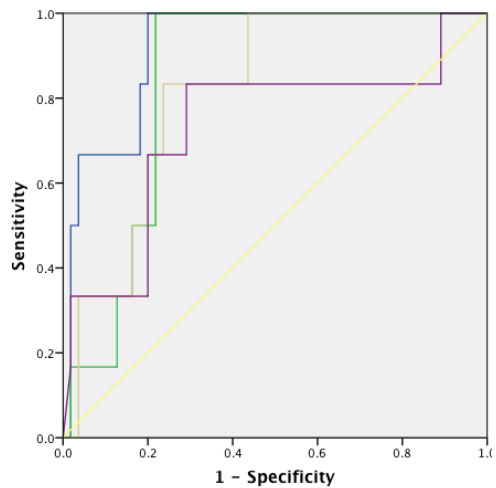
Najveću sposobnost da predvidi AKI u pretermiskog novorođenčeta pokazao je AUC-ROC za uNGAL u AKIN1 grupi u DAN₁₂ sa AUC=0.90[CI95%(0.63-0.99)]p=0.000. Tabela 12; Figura 10(b). Učinak uNGAL merenog u različitim vremenskim periodima kao prediktora za razvoj AKI u grupama (ne-AKI/AKIN1/AKIN2): AUC-ROC je bio savršen u predviđanju AKI u AKIN1 u DAN₁₂ i DAN₁₂ (0.85 i 0.90 ovim redom), dok je bio dobar za predviđanje AKI u grupi DAN₁₄ kao i DAN₁₂ i DAN₁₆. Istovremeno je uNGAL bio koristan u predviđanju AKIN2, gde je u DAN₁₂ najveća vrednost AUC-ROC iznosila AUC=0.69[CI95%(0.40-0.90)] p=0.387. Tabela 12; Figura 10(c).



a)AKI



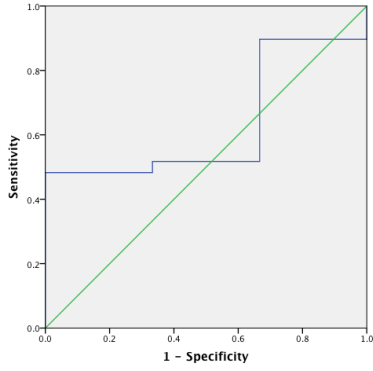
b) AKIN1



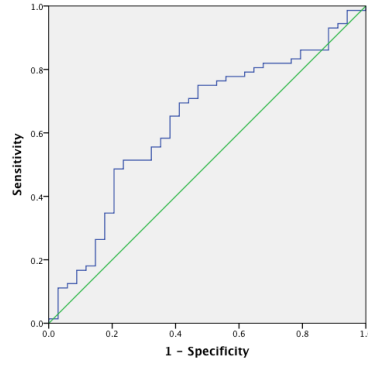
c) AKIN2

Figura 10. (a,b,c) ROC krive za uNGAL: u AKI/AKIN1/AKIN2, u svim vremenima

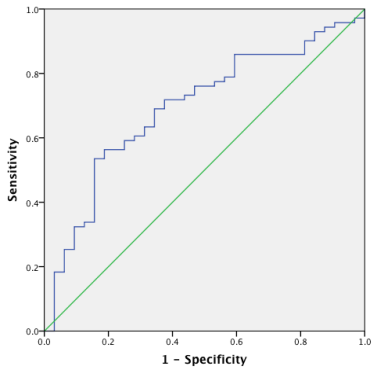
Legend: [DAN: dan života, sva vremena :- **DAN1₂^h**; **DAN1₄^h**; **DAN1₆^h** **--DAN3**; **--DAN7**], *Statistically significant differences (p<0.05)*



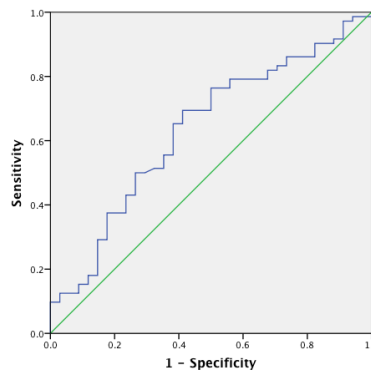
2h



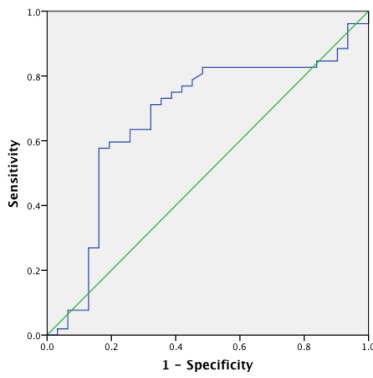
3 dan



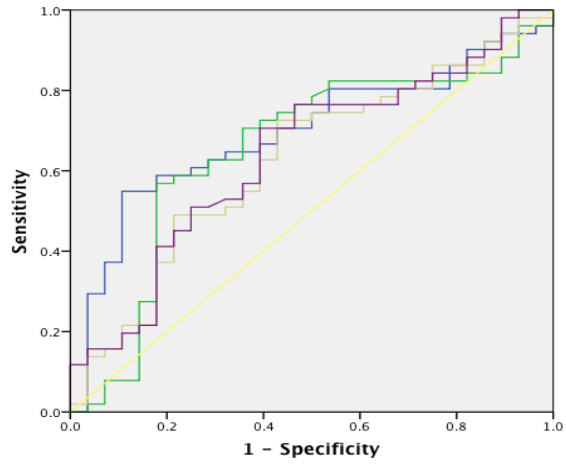
4h



7 dan

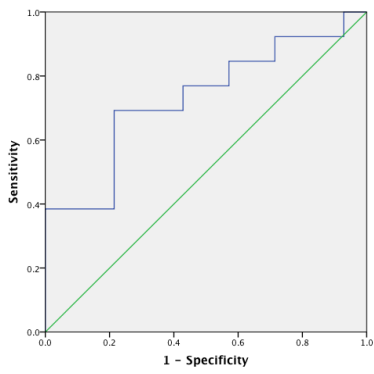


6h

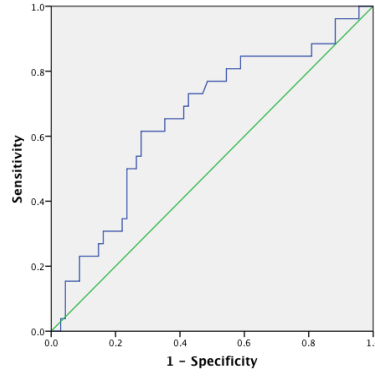


All: 2h (-) 4d(-) 6h(-) 3dan (-) 7dan (-)

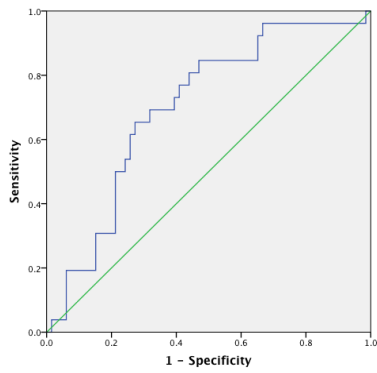
Figura 11. ROC krive za uNGAL (1₂, 1₄, 1₆, 3dan, 7dan, svel) za AKI



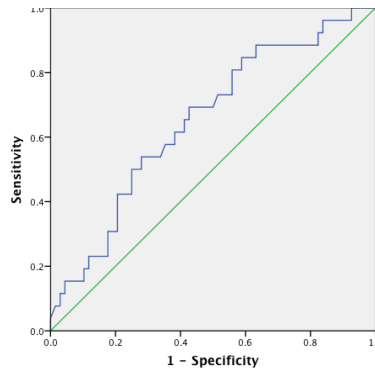
2h



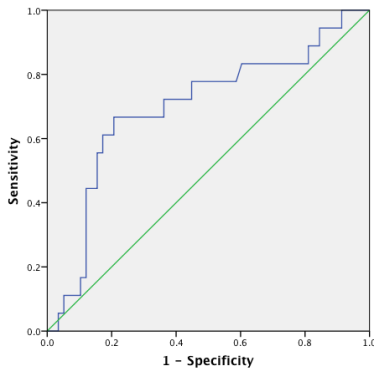
3 dan



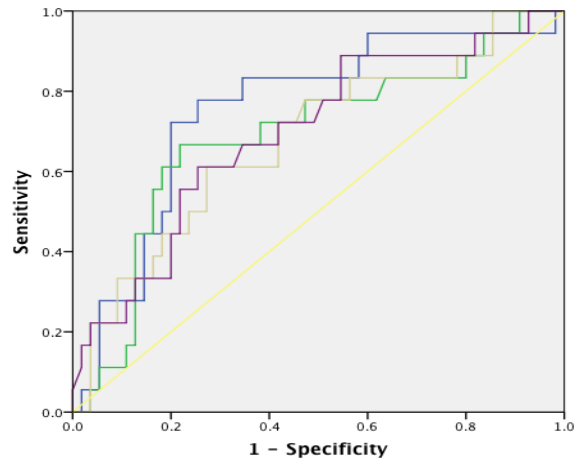
4h



7 dan



6h



Svi: 2h (-) 4d(-) 6h(-) 3dan (-) 7dan (-)

Figura 12. ROC krive za uNGAL (1₂, 1₄, 1₆, 3dan, 7dan, sve) za AKIN1

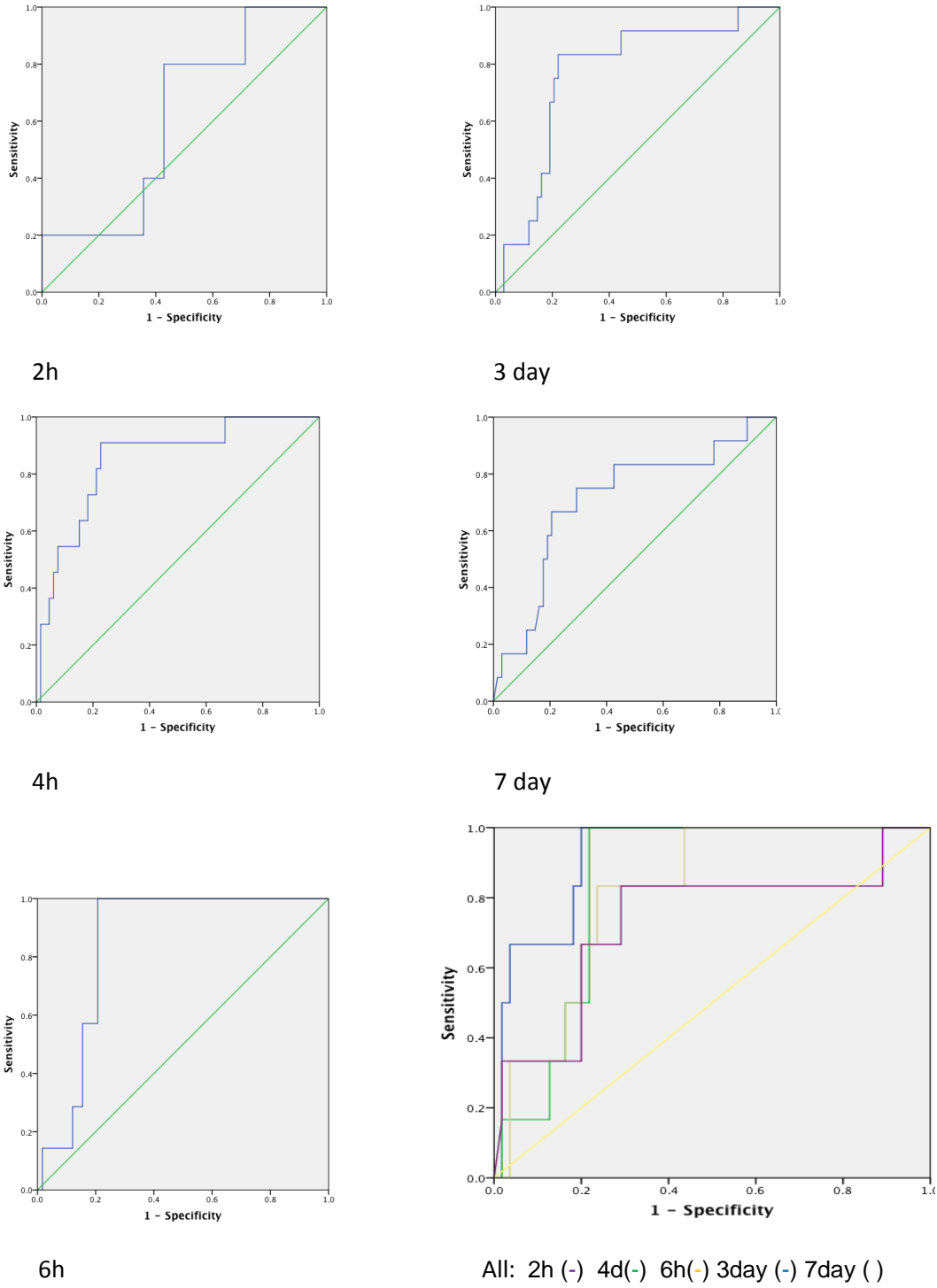


Figura 13. ROC krive za uNGAL (1₂, 1₄, 1₆, 3dan, 7dan, svi) za AKIN2

Tabela 13. Logistička regresiona analiza riziko-faktora za razvoj:

AKI/AKIN1/AKIN2, za uNGAL

	Riziko faktori	OR	95% CI	p	Prilagođen na (a) OR	95% CI	p
AKI vs. non-AKI	Pol	1.318	0.513-3.388	0.567			
	Gestacija (nedelje)	0.715	0.509-1.006	0.054			
	Apgar skor 5 min.	0.785	0.558-1.104	0.164			
	Porodajna telesna masa, g	1.000	0.737-1.077	0.581			
	BD(mmol/L)	0.891	0.737-1.077	0.232			
	uNGAL DAN ₁₂	0.986	0.902/1.078	0.760	21.107	0.000	0.995
	uNGAL DAN ₁₄	1.006	0.992-1.021	0.411	1.005	0.989-1.021	0.534
	uNGAL DAN ₁₆	1.005	0.991-1.020	0.456	839.265	0.990-1.021	0.484
	uNGAL DAN ₃	1.000	0.986-1.014	0.954	1.000	0.985-1.015	0.484
	uNGAL DAN ₇	1.002	0.981-1.022	0.879	1.000	0.979-1.022	0.998
AKIN2 vs. AKIN1	Pol (muški)	2.135	0.378-12.059	0.390			
	Gestacija (nedelje)	0.620	0.284-1.353	0.230			
	Apgar skor 5 min.	1.339	0.696-2.575	0.381			
	Porodajna telesna masa, g	1.001	0.999-1.004	0.241			
	BD (mmol/L)	0.667	0.468-0.948	0.024			
	uNGAL DAN ₁₂	0.989	0.900-1.087	0.817	0.967	0.755-1.240	0.794
	uNGAL DAN ₁₄	1.006	0.987-1.026	0.537	1.008	0.985-1.031	0.513
	uNGAL DAN ₁₆	1.013	0.992-1.036	0.232	1.017	0.982-1.053	0.357
	uNGAL DAN ₃	0.999	0.976-1.023	0.595	1.002	0.977-1.029	0.866
	uNGAL DAN ₇	1.007	0.979-1.035	0.620	1.007	0.973-1.041	0.696

CI: Interval poverenja; OR: odds ratio: odnos šansi; ^aPrilagođen na: (pol, gestaciju, 5-min Apgar skor, porodajnu telesnu masu, BD)

Sumirane univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza: U AKI grupi rizik od AKI je progresivno rastao kako je uNGAL progresivno rastao po prijemu u NICU u prvom danu hospitalizacije u četvrtom i šestom satu prvog dana: DAN₁₄: OR=1.006 sa 95% CI (0.992-

1.021); DAN₁₆: OR=1.005 sa 95%CI (0.991-1.020), kao i u trećem danu DAN₃: OR=1.000 sa 95% CI (0.986-1.014) i DAN₇: OR =1.002 sa 95% CI(0.981-1.022). Multivarijantna logistička regresiona analiza je otkrila da su visoke vrednosti uNGAL u AKI grupi u svim tačkama merenja bili značajni prediktori AKI nakon adžastiranja na pridružene varijable: DAN₁₂: OR=21.107 sa 95% CI =(0.000...); DAN₁₄ OR=1.005 sa 95% CI=(0.989-1.021); DAN₁₆: OR=839.265 sa 95% CI (0.990-1.021); DAN₃: OR=1.000 sa 95% CI (0.985-1.015); DAN₇: OR=1.000 sa 95% CI (0.979-1.022) tim redom. Kada je AKIN2 grupa u pitanju ovaj marker je takođe bio značajan prediktor za razvoj AKIN2 i sam u DAN₁₄: OR=1.006 sa 95% CI (0.987-1.026); DAN₁₆: OR=1.013 sa 95% CI (0.992-1.036) i u DAN₇: OR=1.007 sa 95% CI (0.979-1.035) i adastiran u DAN₁₄: OR=1.008 sa 95% CI (0.985-1.031); DAN₁₆ OR=1.017 sa 95% CI (0.982-1.053); takođe u DAN₃: OR=1.002 sa 95% CI (0.977-1.029) i DAN₇ OR=1.007 sa 95% CI (0.973-1.041), Tabela13.

KORELACIJE

Tabela 14. Korelacija između vrednosti uNGAL izmerenih u različitim tačkama merenja.

BIOMARKER		uNGAL DAN1 ₂	uNGAL DAN1 ₄	uNGAL DAN1 ₆	uNGAL DAN3	uNGAL DAN7
uNGAL- DAN1 ₂	Pearson Correlation	1	.813**	.802*	.662**	.120
	p		.002	.017	.007	.659
	N	17	11	8	15	
uNGAL- DAN1 ₄	Pearson Correlation	.813**	1	.872**	.702**	.566**
	p	.002		.000	.000	.000
	N	11	98	58	92	97
uNGAL- DAN1 ₆	Pearson Correlation	.802*	.872**	1	.930**	.728**
	p	.017	.000		.000	.000
	N	8	58	62	60	61
uNGAL-DAN3	Pearson Correlation	.662**	.702**	.930**	1	.737**
	p	.007	.000	.000		.000
	N	15	92	60	100	99
uNGAL-DAN7	Pearson Correlation	.120	.566**	.728**	.737**	1
	p	.659	.000	.000	.000	
	N	16	97	61	99	105

**Correlation is significant at the 0.01level (p). *Correlation is significant at the 0.05level (p). Korelacija između vrednosti uNGAL izmerenih u različitim tačkama merenja. Statistički visoko značajna pozitivna korelacija je postojala između vrednosti u NGAL izmerenog u: DAN1₂ sa (DAN1₄;p=0.000,DAN1₆; p=0.017, DAN3; p=0.007)

DAN1₄ sa (DAN1₂;p=0.002, DAN1₆; p=0.000, DAN3; p=0.000, DAN7; p=0.000)

DAN1₆ sa (DAN1₂;p=0.017, DAN1₄; p=0.000, DAN3; p=0.000, DAN7; p=0.000)

DAN3 sa (DAN1₂;p= 0.007, DAN1₄; p= 0.000, DAN1₆; p=0.000, DAN7; p= 0.000)

DAN7 sa (DAN1₄;p=0.000, DAN1₆; p=0.000, DAN3; p=0.000)

4.1.1.4. Odnosi urin (uNGAL) / serum (sNGAL)

Tabela 15. Vrednosti uNGAL i sNGAL u svim tačkama merenja u ispitivane novorođenčadi

Biomarker	N	Minimum	Maximum	Mean	±SD
uNGAL DAN1 ₂	17	1.90	189.50	72.75	53.99
uNGAL DAN1 ₄	98	2.70	543.10	88.12	95.76
uNGAL DAN1 ₆	62	2.50	556.20	112.69	134.41
uNGAL DAN3	100	2.80	567.57	102.94	111.75
uNGAL DAN7	105	2.25	349.30	69.42	74.70
sNGAL, DAN1 ₂	103	12.54	343.87	126.40	99.13
sNGAL, DAN1 ₄	108	12.40	409.40	136.46	109.10
sNGAL, DAN1 ₆	106	10.60	405.30	137.39	103.76
sNGAL DAN3	107	14.80	543.80	118.69	89.76
sNGAL DAN7	107	7.42	409.60	96.56	72.14

Na pitanje da li postoji i kakva je veza između vrednosti uNGAL i sNGAL u istoj tački merenja u istog ispitanika?

Korelacionom analizom je pokazano da postoji statistički značajna povezanost između ovih vrednosti, odnosno između ova dva biomarkera u 4 i 6 satu prvoga dana i u trećem danu ispitivanja. To pokazuju vrednosti Pirsonovog koeficijenta korelacije koje su iznosile:

Formirani parovi (uNGAL i sNGAL) u istim tačkama merenja u AKI grupi:

Biomarcers (pair)	N	p
uNGAL-sNGAL:	16	0.005
uNGAL-sNGAL:	97	0.000
uNGAL-sNGAL:	59	0.004
uNGAL-sNGAL:	99	0.000

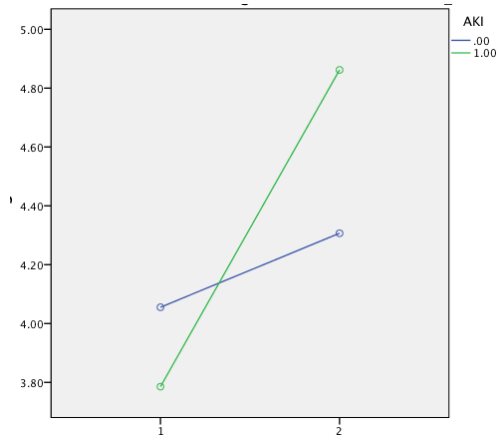
Kakva je povezanost između formiranih parova u istim tačkama merenja?

Svi parovi su pokazali značajnu promenu vrednosti u istim tačkama merenja kod jednog istog deteta, što pokazuju vrednosti t-testa i $p < 0.05$. Značajnost razlike između vrednosti urinarnog uNGAL i serumskog sNGAL u istim tačkama merenja testirana je Studentovim t-testom koji je pokazao sledeće:

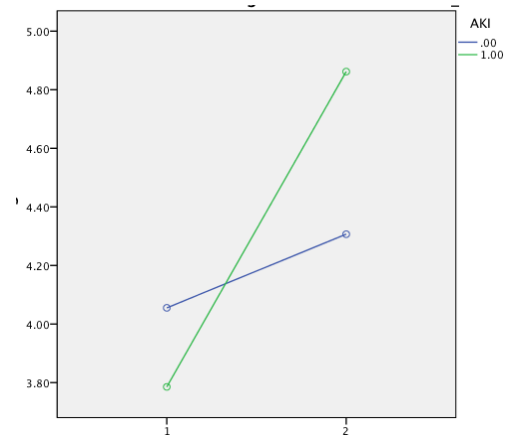
Figura 1: non-AKI vs AKI

- a) DAN₂: uNGAL / sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.005$
- b) DAN₄: uNGAL / sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.000$
- c) DAN₆: uNGAL / sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.004$
- d) DAN₃: uNGAL / sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.002$
- e) DAN₇: uNGAL / sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.000$

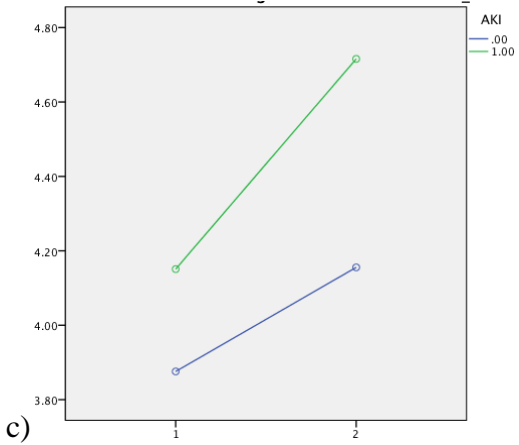
Srednje vrednosti uNGAL i sNGAL u ne-AKI grupi se nisu značajno razlikovale: to znači da u non-AKI grupi nije došlo do značajnog porasta ni jednog ispitivanog biomarkera i ta razlika nije statistički značajna. U AKI grupi je razlika između ovih srednjih vrednosti bila statistički značajna. Figura 17: (a,b,c.), u AKI grupi je serumski sNGAL brže rastao od urinarnog uNGAL i ta razlika je statistički značajna. Za razliku od ovih u trećem i sedmom danu merenja postojala je statistički značajna razlika između srednjih vrednosti uNGAL i sNGAL i u ne-AKI i AKI grupi.



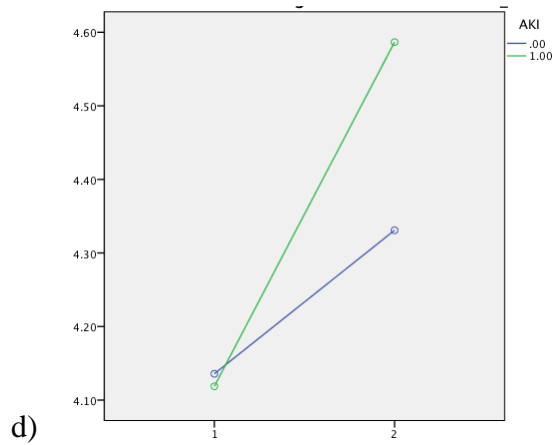
a)



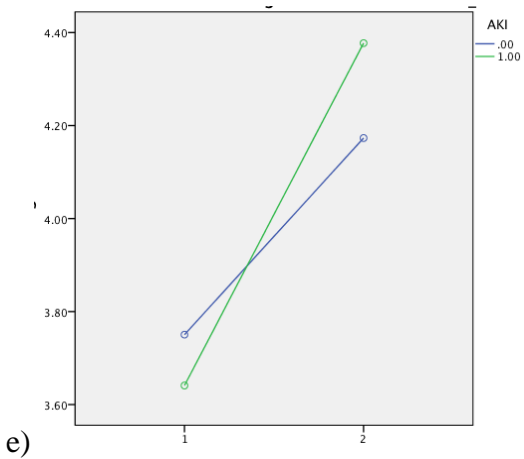
b)



c)



d)



e)

Figura 14. ne-AKI /AKI

Figura 18. AKIN1 vs AKIN2

- a) DAN1^{2th}: uNGAL / sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.001$
- b) DAN1^{4th} uNGAL / sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.001$
- c) DAN1^{6th} uNGAL / sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.001$
- d) DAN3 uNGAL / sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.001$
- e) DAN7 uNGAL / sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.000$

- a) Srednje vrednosti uNGAL i sNGAL AKIN1 grupi su se značajno razlikovale: to znači da je AKIN1 grupi došlo do značajnog porasta sNGAL i da je ta razlika statistički značajno različita. $p < 0.008$. U AKIN2 grupi takođe je bio značaj porast sNGAL, statistički značajan u odnosu na uNGAL, mada je ta razlika u ovoj grupi bila manje izražena. $p < \dots$

$F = 9.381$; $p < 0.008$, unutar grupne razlike

$F = 245.705$; $p < 0.000$ među grupne razlike, vrednost Fišerovog varijansnog količnika pokazuje da su razlike među grupama u odnosu na koncentracije NGAL i promene u različitim grupama statistički veoma različite .

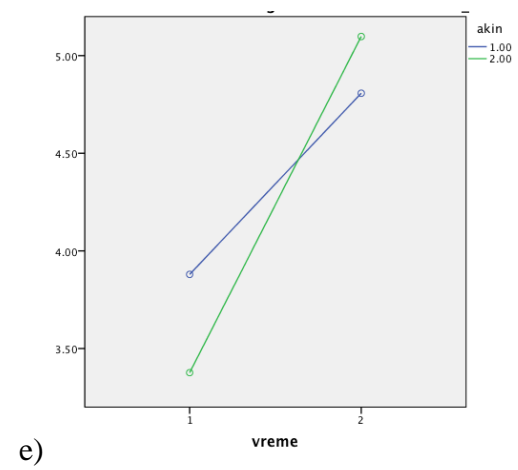
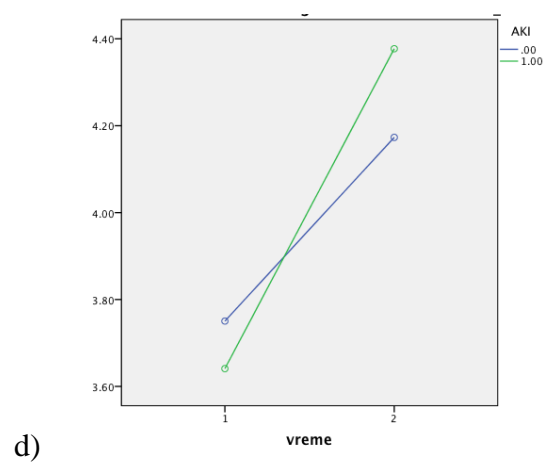
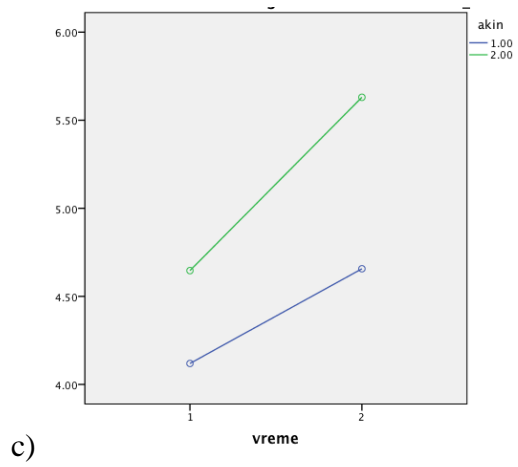
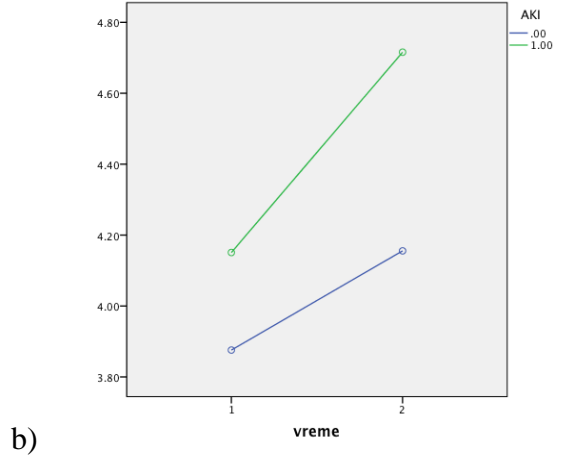
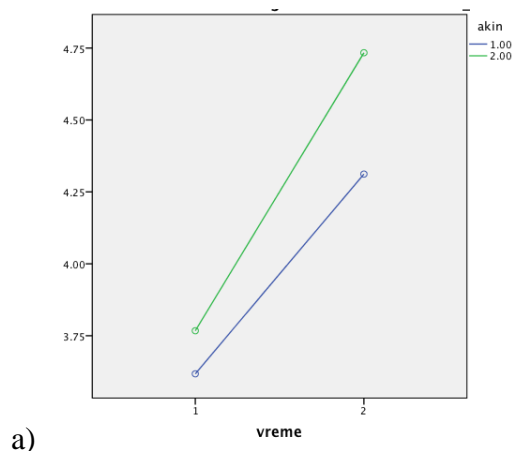


Figura 15. AKIN1 /AKIN2

Figura 19. ne-AKI vs AKIN1 vs AKIN2

a) DAN1^{2th}: uNGAL vs sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.001$

b) DAN1^{4th} uNGAL vs sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.000$

c) DAN1^{6th} uNGAL vs sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.000$

d) DAN3 uNGAL vs sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.015$

e) DAN7 uNGAL vs sNGAL postoji statistički značajna razlika $p < 0.000$

U ovom delu su prikazane vrednosti u svih ispitanika po grupama.

Korelacijom koja testira povezanost između parova biomarkera uNGAL i sNGAL u istim tačkama merenja nalazimo da ta povezanost u drugom satu nije značajna, ali u 4,6 satu prvoga dana i trećem danu povezanost je značajna

DAN1₄ cc= 0.39; $p < 0.000$; DAN1₆ cc= 0.48; $p < 0.000$; DAN3; cc= 0.24; $p < 0.015$

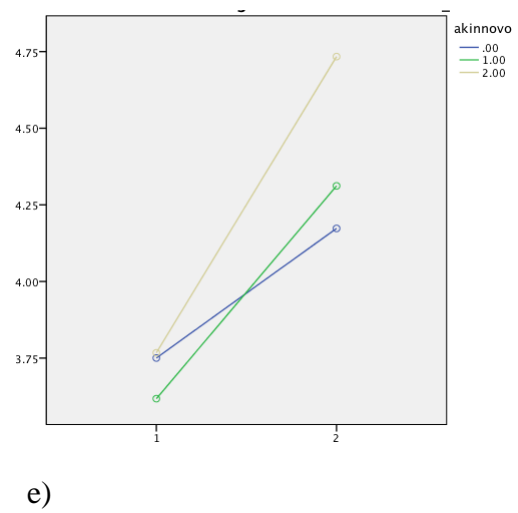
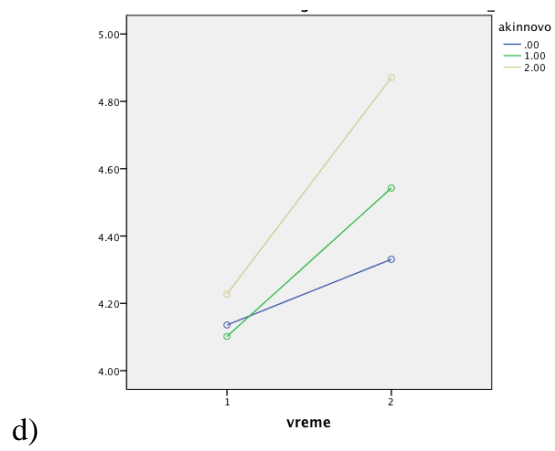
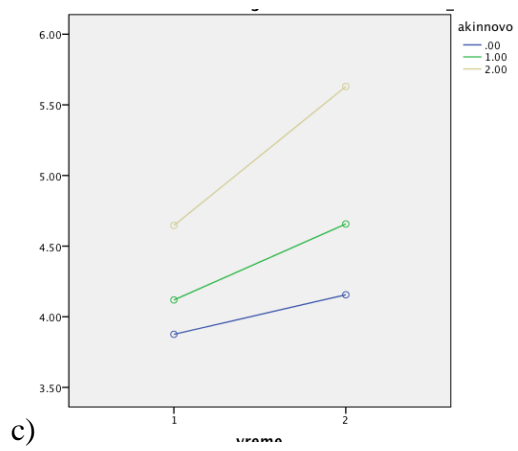
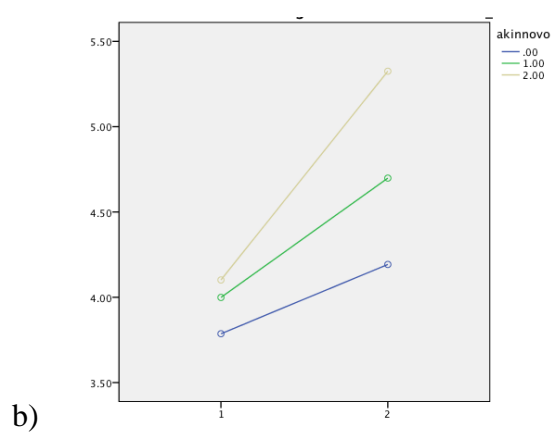
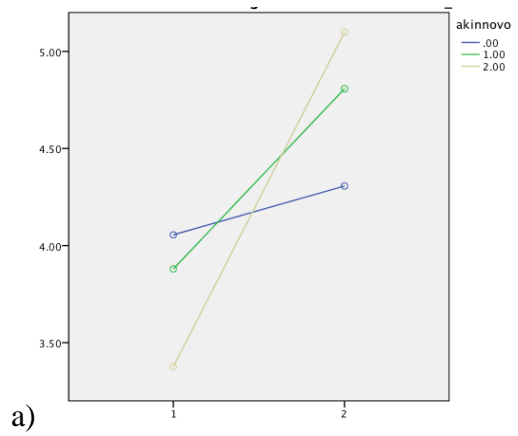
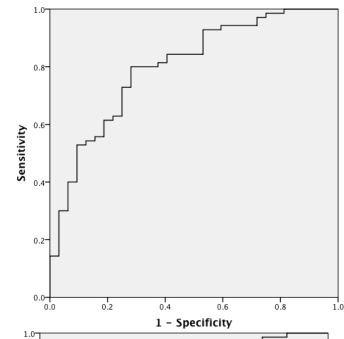


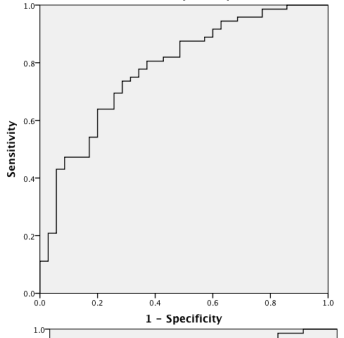
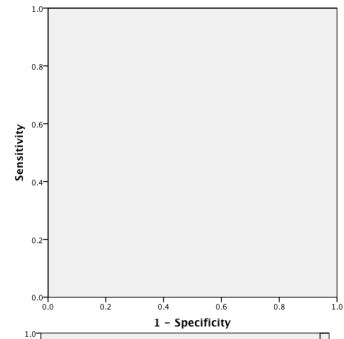
Figura 16. ne-AKI/AKIN1/AKIN2

- a) AUC-ROC= nema značaja
- b) AUC-ROC=0.80[95%(0.70-0.89)] p<0.000 za AKI DAN1₂
- c) AUC-ROC=0.72[95%(0.61-0.82)] p<0.000 za AKI DAN1₄
- d) AUC-ROC=0.78[95%(0.68-0.87)] p<0.000 za AKI DAN1₄
- e) AUC-ROC=0.72[95%(0.59-0.84)] p<0.000 za AKI DAN1₆
- f) AUC-ROC=0.77[95%(0.68-0.86)] p<0.000 za AKI DAN1₆
- g) AUC-ROC=0.71[95%(0.60-0.81)] p<0.001 za AKI DAN3
- h) AUC-ROC=0.73[95%(0.63-0.83)] p<0.000 za AKI DAN3
- i) AUC-ROC=0.71[95%(0.61-0.82)] p<0.000 za AKI DAN7
- j) AUC-ROC=0.70[95%(0.59-0.80)] p<0.001 za AKI DAN7

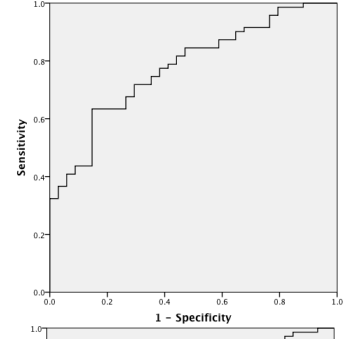
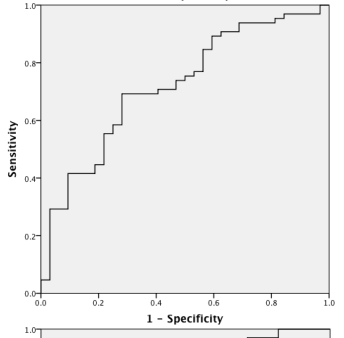
LOGISTIČKI ODNOSI URIN-KRV



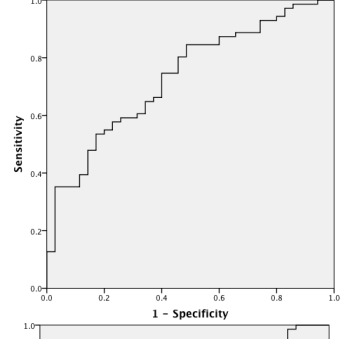
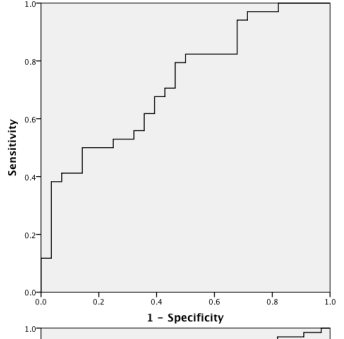
2h



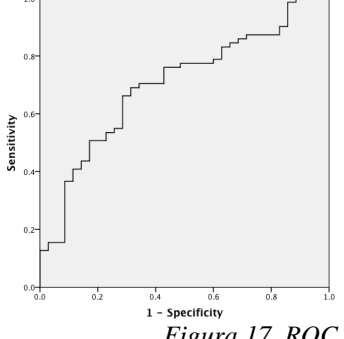
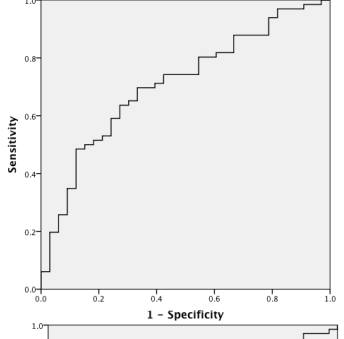
4h



6h



3dan



7dan

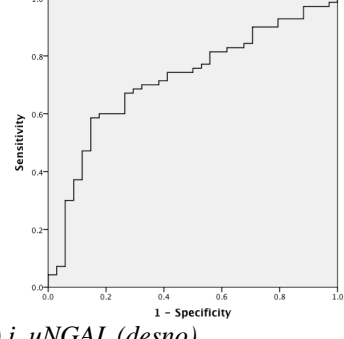


Figura 17. ROC krive za sNGAL (levo) i uNGAL (desno)

4.1.1.5. KIM-1, Molekul bubrežnog oštećenja-1

Vrednosti urinarnog KIM-1

Tabela 16. uKIM1: (pg/ml) u preterminske novorođenčadi po grupama:

ne-AKI/AKIN1/AKIN2

KIM1	ne-AKI	AKI	p	AKIN ₁	AKIN ₂	p
DAN ₁₂ -n;17 mean±SD	5 395.70 ± 1 29.89	12 368.12 ± 276.19	0.856	12 368.12 ± 276.19	nm	
DAN ₁₄ -n;106 mean±SD	34 406.98 ± 323.07	72 699.99 ± 431.57	0.001	60 662.00 ± 429.54	12 888.92 ± 407.23	0.097
DAN ₁₆ -n;51 mean±SD	21 426.83 ± 247.29	30 683.80 ± 489.22	0.032	26 649.38 ± 488.42	4 907.57 ± 498.60	0.334
DAN ₃ -n;105 mean±SD	33 396.15 ± 292.07	72 514.78 ± 372.85	0.110	60 510.28 ± 368.50	12 537.31 ± 410.27	0.821
DAN ₇ -n;102 mean±SD	33 339.06 ± 254.87	69 347.58 ± 331.41	0.897	58 342.38 ± 331.69	11 375.00 ± 344.82	0.767

DAN=dan života, AKI: Acute kidney injury, ne-AKI: bez AKI, uKIM1: urinary kidney injury molecule -1 [KIM1 (pg/ml)], AKIN klasifikacija: Acute Kidney Injury Network; AKIN1: Stepen1 po AKIN klasifikaciji; AKIN2: Stepen2 po AKIN klasifikaciji; p<0.05

Tabela 16. Prikazuje vrednosti KIM1 merene u svim tačkama merenja po grupama.

Analiza izmerenih vrednosti KIM-1 je pokazala da su statistički značajne razlike u vrednostima ovog biomarkera zabeležene između dve osnovne grupe ispitanika ne-AKI/AKI. Ovaj deo ispitivanja značajan je po tome što je u njemu ostvaren veliki broj merenja, u svim tačkama ispitivanja sem DAN₁₂, drugog sata prvog dana ispitivanja. Statistički visoko značajne razlike zabeležene su između vrednosti KIM-1 u DAN₁₄ (ne-AKI vs AKI ; p=0.001), a značajne u DAN₁₆ (ne-AKI vs AKI; p=0.032).

Fišerova jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima: Horizontalna analiza:

Dinamiku promene vrednosti KIM1 u vremenu, značajnost te promene u različitim AKI kategorijama analizira Fišerova jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima. Tabela 2 i Figura 1 (a,b,c), horizontalna analiza. ANOVA pokazuje da se vrednosti KIM1 značajno

menjaju kroz vreme i različito u različitim grupama: Vrednosti Fišerovog varijansnog količnika i vrednosti (p) pokazuju značajnost te promene u analiziranim grupama: Figura 1 (a,b,c): Horizontalna analiza pokazuje tri vremenske odrednice, tačke merenja: DAN1₄, DAN3, DAN7 po grupama: ne-AKI/AKIN1/AKIN2.

Figura 22 (a,b), vertikalna analiza.

- a) [ne-AKI / AKI (F 4.942; p=0.029)];
- b) [AKIN1 / AKIN2 (F1220; p=0.273)];
- c) [ne-AKI / AKIN1/ AKIN2; (F= 3182; p=0.046)]

Figura 21(a, b, c): Horizontalna analiza: promena KIM1 u tri tačke ispitivanja: (DOL1₄, DOL3, DOL7) po grupama:

- a) ne-AKI i AKI u DAN1₄, DAN3, DAN7

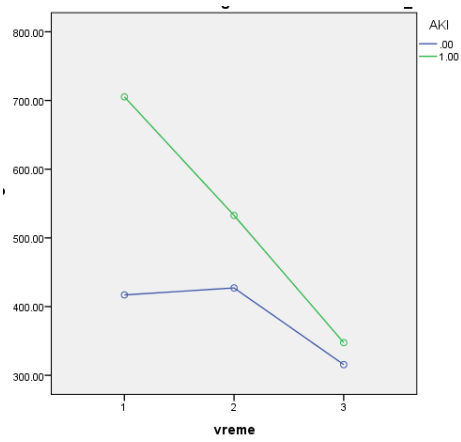
Prikazuje vrednosti KIM1 izmerene u tri tačke merenja, prvog (DAN1₄), trećeg (DAN3) i sedmog dana ispitivanja (DAN7) u dve osnovne grupe ispitanika non-AKI i AKI. Prikazan je rani porast vrednosti KIM1 već u prvom danu ispitivanja sa statistički značajnom razlikom između ne-AKI i AKI u DAN1₄ p=0.001, između ispitivanih grupa. Ova vremenska odrednica je veoma značajna po velikom broju uzoraka koje smo dobili (106), i veoma rano pokazali statistički značajnu razliku u dve osnovne grupe ispitanika. Figura 18(a)

- b) AKIN1 i AKIN2 u DAN1₄, DAN3, DAN7

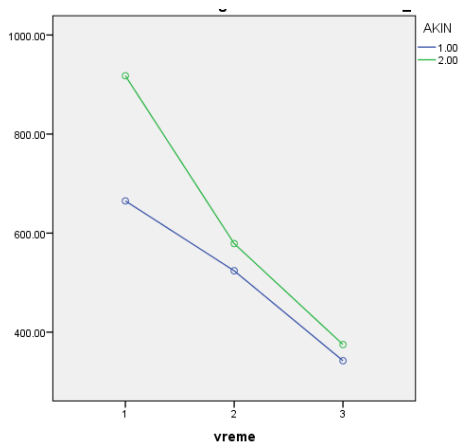
Porast KIM1 u AKIN1 i AKIN2 registruje se rano u DOL1₄ u obe grupe ispitanika, taj porast je veći u AKIN2 grupi. Vrednosti rano rastu u prvom danu života, više u AKIN2 nego AKIN1, zatim padaju. U trećem danu su gotovo izjednačene a zatim padaju dalje od sedmog dana života. Te razlike nisu statistički značajne (p=0.09 za DOL1₄) Figura 18(b)

- c) ne-AKI/AKIN1/AKIN2 u DAN1₄, DAN3, DAN7

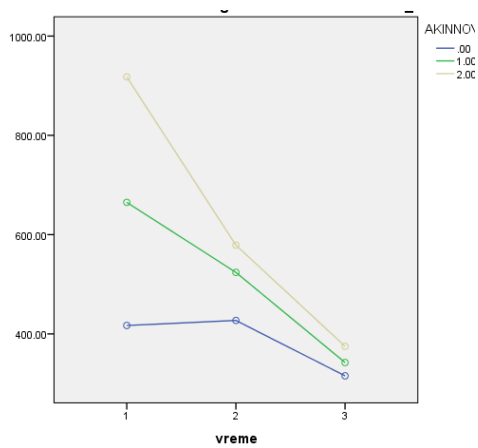
Prikazuje vrednosti KIM1 u tri tačke vremena u svim analiziranim grupama pretermnske novorođenčadi ne-AKI/AKIN1/AKIN2. Početne vrednosti KIM1 u svih ispitanika koji su imali AKI su visoke (AKIN1 i AKIN2) statistički značajno različite u odnosu na ispitanike bez AKI (ne-AKI) ta razlika je statistički značajna (DAN1₄; p=0.001). Figura 18(c)



a) non-AKI/AKI



b) AKIN1/AKIN2



c) non-AK/AKIN1/AKIN2I

Figura 18.(a,b,c) Vrednosti KIM1u tri tačke merenja (DAN1₄, DAN3, DAN7) u ispitivanim grupama non-AKI/AKIN1/AKIN2, horizontalna analiza

Vertikalna analiza:

Figura 19 (a, b): Vertikalna analiza: promena vrednosti KIM1 u svim tačkama merenja po grupama.

a) ne-AKI / AKI u DAN1₂, DAN1₄, DAN1₆, DAN3, DAN7

b) AKIN1 / AKIN2 u DAN1₂, DAN1₄, DAN1₆, DAN3, DAN7

Figura 19 (a,b,): Vertikalna analiza: Prikazuje promena vrednosti KIM1 u svim tačkama merenja u sve ispitivane novorođenčadi po grupama: DAN1₂, DAN1₄, DAN1₆, DAN3, DAN7.

Figura 19 (a) Svi ispitanici u ne-AKI i AKI grupi.

Figura 19 (b) Vrednosti KIM1 u AKIN1 i AKIN2 grupi.

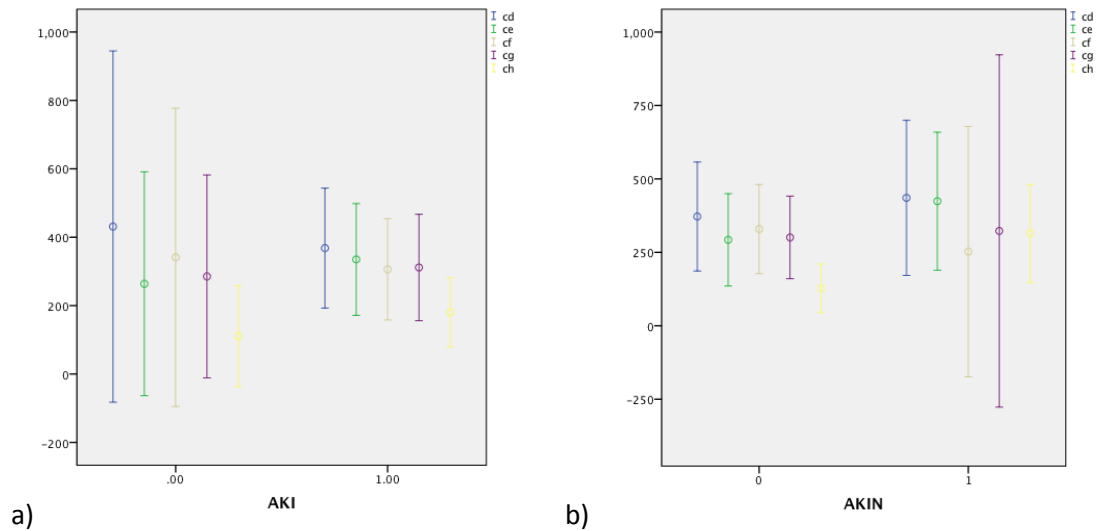


Figura 19 (a,b) KIM1 u

a) ne-AKI/AKI i u

(Legenda: X osa: 0.00: ne-AKI; 1.00 AKI,

Y osa: ---DAN1₂, ---DAN1₄, --- DAN₆, --- DAN3, --- DAN7)

b) AKIN1/AKIN2I

Legenda: X osa: 0:AKIN1, 1:AKIN2

Y axis: ---DAN1₂, ---DAN1₄, --- DAN1₆--- DAN3, --- DAN7

AUC-ROC KIM-1

Table 17. Dijagnostičke karakteristike urinarnog KIM-1 kao biomarkera akutnog oštećenja bubrega po AKIN klasifikaciji u svim vremenima

	BIOMARKERS Predictorske varijable	n	AUC	95% CI	p	Optimal cutoff value	Sensitivity (%)	Specificity (%)	LR+	LR-
non-AKI vs. AKI	KIM1, DAN ₂	12	0.47	0.14 - 0.80	0.874	57.7	71.43	100.0	1.69	0.29
	KIM1, DAN ₄	72	0.70	0.60 - 0.81	0.001	54.9	63.79	70.00	2.13	0.52
	KIM1, DAN ₆	30	0.63	0.47 - 0.78	0.014	876.0	38.70	100.0	7.47	0.57
	KIM1, DAN ₃	72	0.60	0.48 - 0.71	0.116	765.32	27.8	90.90	4.17	0.75
	KIM1, DAN ₇	69	0.47	0.35 - 0.58	0.614	242.4	57.7	57.60	1.33	0.72
AKIN1 vs. AKIN2	KIM1, DAN ₂	0								nm
	KIM1, DAN ₄	12	0.67	0.52 - 0.81	0.065	548.11	91.7	67.6	1.66	0.42
	KIM1, DAN ₆	4	0.66	0.42 - 0.90	0.300	780.26	75.0	89.2	2.00	0.50
	KIM1, DAN ₃	12	0.51	0.33 - 0.69	0.868	432.2	58.3	58.2	1.81	0.49
	KIM1, DAN ₇	11	0.50	0.30 - 0.69	0.993	98	50.00	73.1	2.12	0.65

Kidney injury molecule-1(KIM1) pg/ml; DAN: dan života; CI Interval poverenja; LR+ Likelihood ratio positive; LR- Likelihood ratio negative; AUC: area under the receiver-operating-characteristic curve

KIM-1, AUC-ROC vrednosti za pojedine grupe i podgrupe ispitivane pretermnske novorođenčadi, Tabela 17.

AKI: Najveću sposobnost da predvidi AKI u pretermnskog novorođenčeta pokazao je AUC-ROC u AKI grupi u DAN₄ sa AUC= 0.70[CI95%(0.60-0.81)]p=0.001, što je po klasifikaciji Mc Naila dobar ! Figura 3.b. Po istoj klasifikaciji vrlo dobar AUC je u AKI grupi ispitanika u DAN₆ i iznosi AUC=0.63[CI95%(0.47-0.78)] p=0.014. Figura 21a. Takođe DAN₃ AUC=0.60[CI95%(0.48-0.71)]p=0.116. Figura 20.

AKIN2: Takođe dobre vrednosti AUC-ROC registrovane u AKIN2 grupi: u DAN₄ sa AUC=0.67[CI95% (0.52-0.81)]p=0.065. Figura 4; u DAN₆ sa AUC=0.66[CI95% (0.42-0.90)]p=0.300. Figura 21c

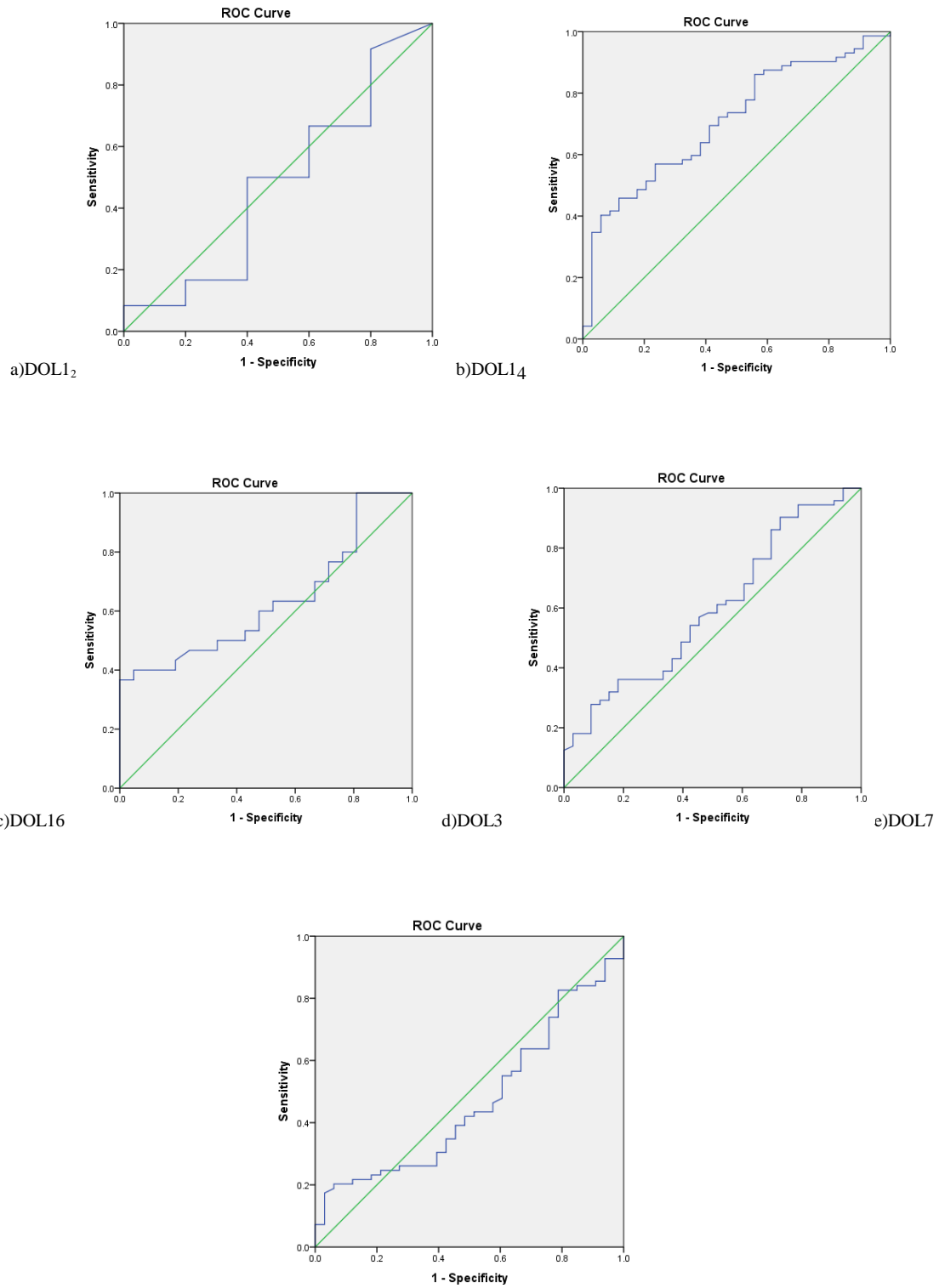
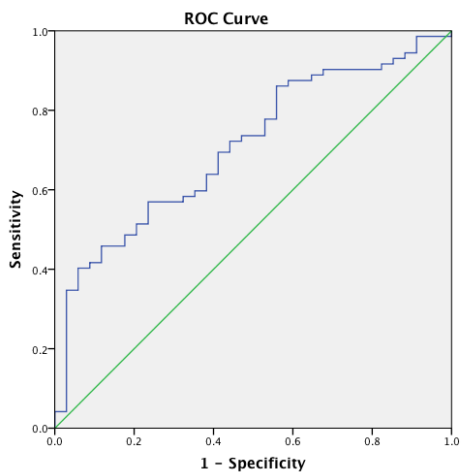
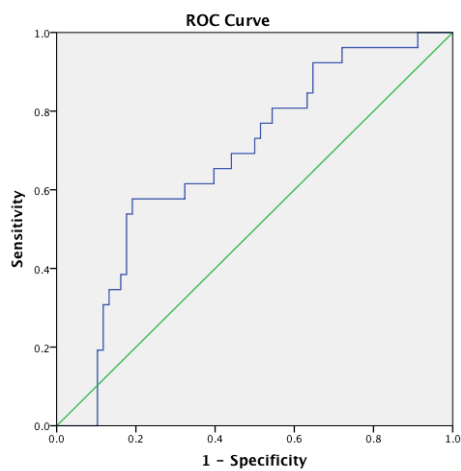


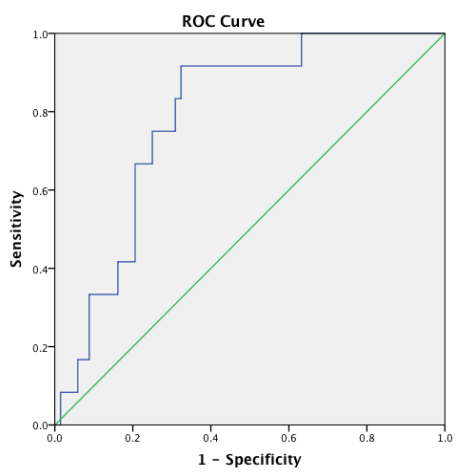
Figura 20. AKI (KIM-1, u svim vremenima)



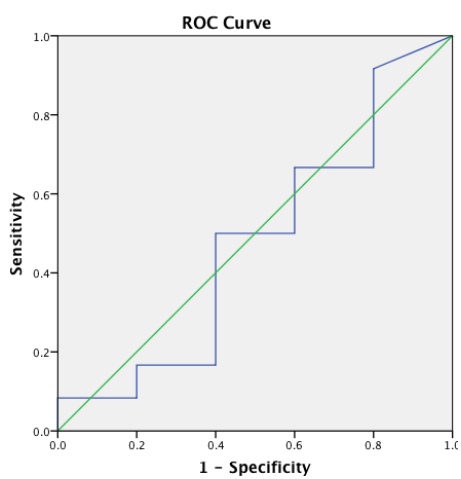
d) DAN14)



e) dan 16



f) DAN3



g) DAN7

Figura 21. AKIN1 (KIM-1)

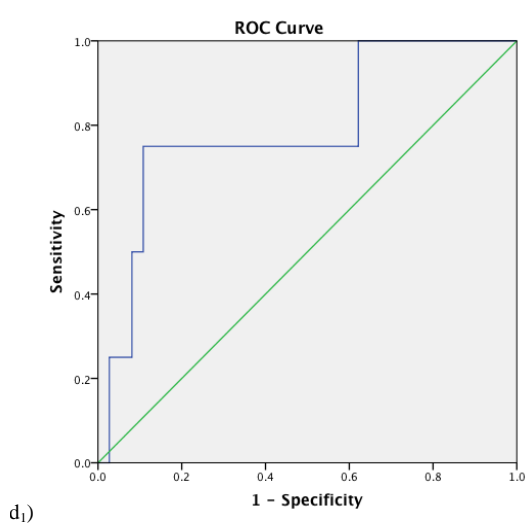
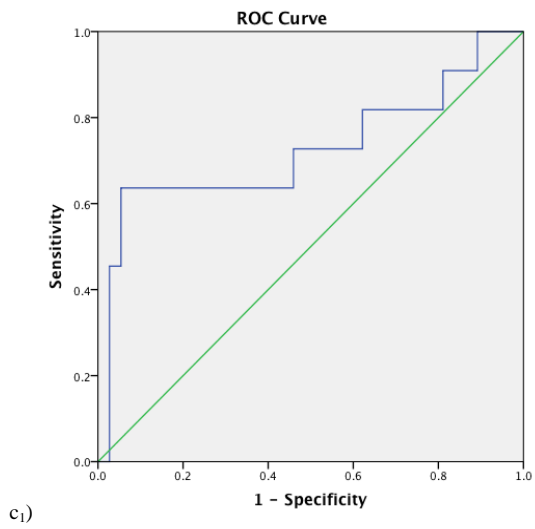
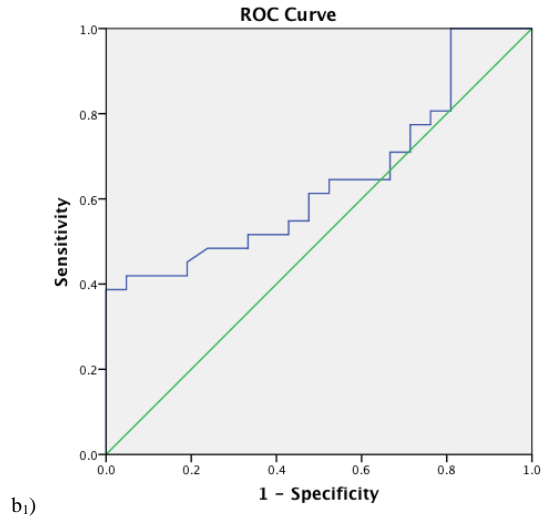
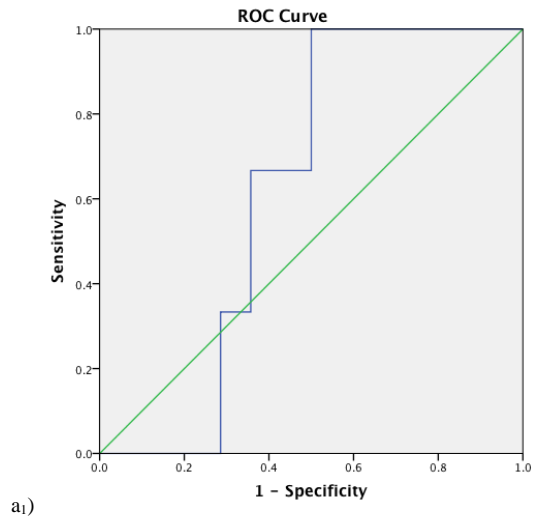


Figura 22. AKIN2 (KIM1)

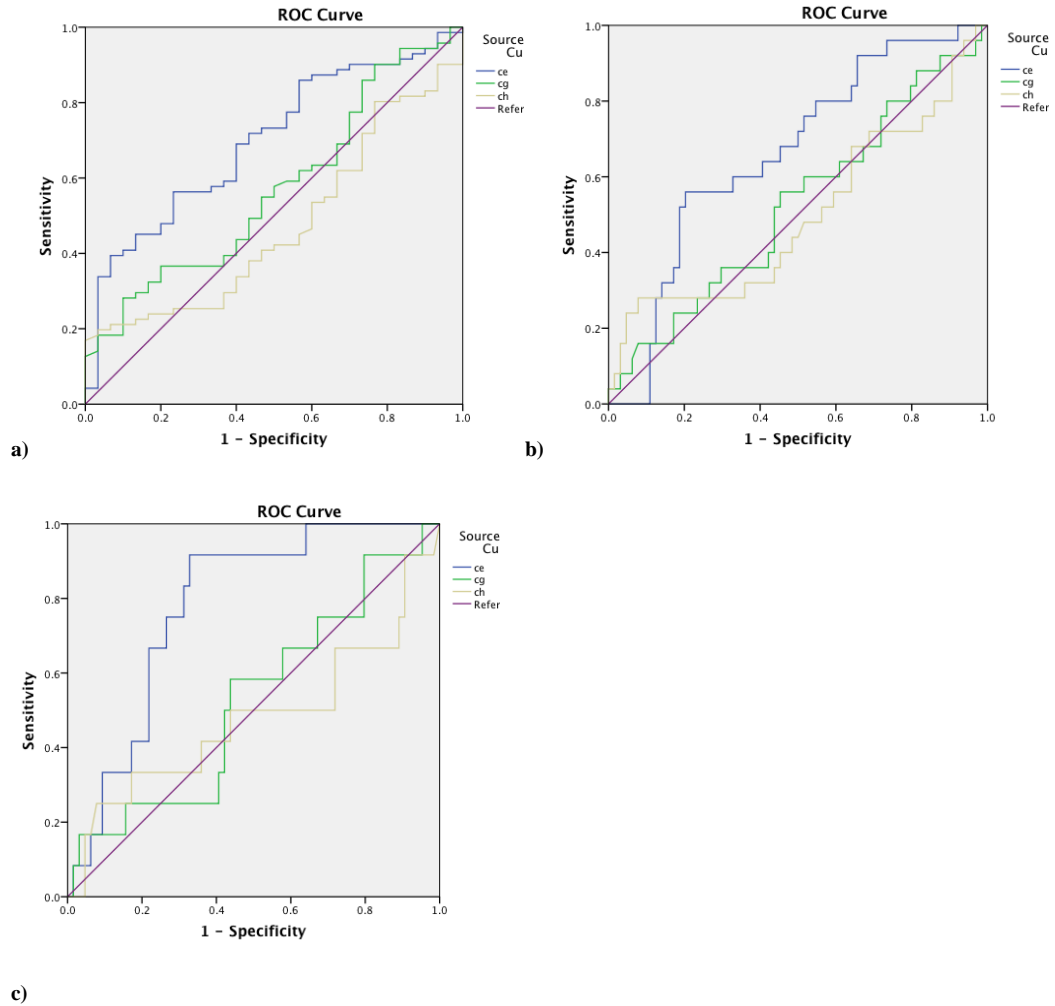


Figura 23. ROC: a) AKI ; b) AKIN1; c) AKIN2

a₁ DAN1₄ AUC-ROC=0.698[95%CI(0.590-0.805)] p=0.002

a₂ DAN3 AUC-ROC=0.569[95%CI(0.450-0.689)] p=0.271

a₃ DAN7 AUC-ROC=0.472[95%CI(0.354-0.590)] p=0.656

b₁ DAN1₄ AUC-ROC=0.663[0.95%CI(0.541-0.784)] p=0.018

b₂ DAN3 AUC-ROC=0.524[0.95%CI(0.388-0.660)] p=0.725

b₃ DAN7 AUC-ROC=0.497[0.95%CI(0.352-0.642)] p=0.967

c₁ DAN1₄ AUC-ROC=0.780[0.95%(0.663-0.897)] p=0.002

c₂ DAN3 AUC-ROC=0.526[0.95%(0.346-0.706)] p=0.776

c₃ DAN7 AUC-ROC=0.478[0.95%(0.267-0.689)] p=0.809

REGRESIJA

Tabela 18. Logistička regresiona analiza faktora rizika za razvoj:
AKI/AKIN1/AKIN2: (KIM-1)

	Factori rizika	OR	95% CI	p	Adjusted ^a OR	95% CI	p
AKI vs. non-AKI	Pol	1.128	0.418-3.048	0.812			
	Gestacija (nedelje)	0.699	0.503-0.972	0.033			
	Apgar skor, 5 min.	0.785	0.563-1.095	0.154			
	Porodajna telesna masa,g	1.000	0.999-1.001	0.584			
	Bazedeficit (mmol/L)	0.895	0.744-1.077	0.240			
	KIM1 DAN ₁ ₂	1.000	0.996-1.004	0.844	0.943	0.000-4.450	1.000
	KIM1 DAN ₁ ₄	1.002	1.001-1.003	0.002	1.002	1.001-1.004	0.001
	KIM1 DAN ₁ ₆	1.002	1.000-1.003	0.041	1.002	1.000-1.004	0.037
	KIM1 DAN ₃	1.001	1.000-1.002	0.112	1.001	1.000-1.003	0.114
	KIM1 DAN ₇	1.000	0.999-1.001	0.895	1.000	0.998-1.001	0.897
AKIN2 vs. AKIN1	Gender (male)	0.933	0.206-4.227	0.928			
	Gestacija (nedelje)	1.072	0.569-2.020	0.829			
	Apgar skor, 5 min.	0.478	0.851-2.566	0.166			
	Porodajna telesna masa, g	1.000	0.998-1.002	0.944			
	Bazedeficit (mmol/L)	0.654	0.485-0.882	0.005			
	KIM1 DAN ₁ ₂	nm			nm		
	KIM1 DAN ₁ ₄	1.001	1.000-1.003	0.103	1.001	0.999-1.003	0.231
	KIM1 DAN ₁ ₆	1.001	0.999-1.003	0.331	1.000	0.997-1.003	0.963
	KIM1 DAN ₃	1.000	0.999-1.002	0.817	0.999	0.997-1.001	0.444
	KIM1 DAN ₇	1.000	0.998-1.002	0.763	1.000	0.998-1.002	0.930

CI Interval poverenja; OR: odnos šansi; ^a Prilagodeno na : (pol, gestaciju,5-min Apgar skor, porodajna telesna masa, bazedeficit)

U Tabeli 18. su sumirane univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza. Rizik od AKI progresivno je rastao sa porastom vrednosti KIM1 u prvom danu, 4 i 6 satu po prijemu: [OR=1002 sa 95%CI=(1.001-1.003)] p=0.002; OR=1.002 sa [95%CI=(1.000-1.003)] p=0.041 tim redom. Multivarijantna logistička regresiona analiza otkrila je da su visoke KIM1 vrednosti u 2 i 4, satu prvog dana bili značajni prediktori AKI nakon “adastriranja” za pridružene varijable

[OR=1.002 sa 95%CI(1.001-1.004)] p=0.001; i OR=1002 sa [95%CI(1.000-1.004)] p=0.037.
Prilagođavanje je izvršeno na kovarijante POL, GES, AS, PTM, BD.

Multivarijantna logistička regresiona analiza otkrila je da su visoke vrednosti KIM1 u AKIN2 podgrupi takođe bile značajni prediktori bolesti samostalno u drugom i četvrtom satu prvog dana merenja: [OR=1001 sa 95%CI=(1.000-1.003)] p=0.103; OR=1.001 sa [95%CI=(0.999-1.003)] p=0.331 tim i nakon ađastiranja na pridružene varijable: [OR=1.001sa 95%CI(0.999-1.003)] p=0.231;iOR=1.00sa[95%CI(0.9971.003)]p=0.963.

KORELACIJE (KORELACIONA ANALIZA):

Jačinu i smer odnosa među varijablama izmerili smo kerelacionom analizom. Jačina linearnog odnosa između dve varijable meri se Pirsonovim koeficijentom linearne korelacije (r).

Tabela19. Korelacija između različitih vrednosti KIM1 u različitim tačkama merenja

		KIM1 DOL1 ₂	KIM DAN1 ₄	KIM1 DOL1 ₆	KIM1 DOL3	KIM1 DOL7
<u>KIM1 DOL1₂</u>	Pearson Correlation	1	.879**	.678**	.687**	.031
	p		.000	.004	.002	.913
	N	17	17	16	17	15
	Pearson Correlation	.879**	1	.856**	.585**	.388**
<u>KIM1 DOL1₄</u>	p	.000		.000	.000	.000
	N	17	106	50	103	101
	Pearson Correlation	.678**	.856**	1	.739**	.667**
<u>KIM1 DOL1₆</u>	p	.004	.000		.000	.000
	N	16	50	51	51	49
	Pearson Correlation	.687**	.585**	.739**	1	.623**
<u>KIM1 DOL3</u>	p	.002	.000	.000		.000
	N	17	103	51	105	100
	Pearson Correlation	.031	.388**	.667**	.623**	1
<u>KIM1 DOL7</u>	p	.913	.000	.000	.000	
	N	15	101	49	100	102

r-Pirsonov koeficijent korelacije, p-verovatnoća, N- broj ispitanika

** . Correlation is significant at the 0.01 level

Tabela 5 pokazuje vrednosti Spirmanovog koeficijenta korelacije (r) između vrednosti KIM1 u svim ispitivanim tačkama, među sobom, koje su veoma visoke u mnogim tačkama analiziranja (**).

Tabela 20. Korelacije između svih urinarnih biomarkera merenih u drugom satu prvog dana

BIOMARKERI		KIM1	sCysC	uNGALa	sNGAL	uNGAL
		DOL1 ₂	DOL1 ₂	DOL1 ₂	DOL1 ₂	DOL1 ₂
<u>KIM1</u> DOL1 ₂	Pearson Correlation	1	-.247	-.163	-.026	.090
	p		.340	.757	.922	.848
	N	17	17	6	17	7
<u>sCysC</u> DOL1 ₂	Pearson Correlation	-.247	1	.171	.164	.139
	p	.340		.512	.101	.595
	N	17	106	17	101	17
<u>uNGALa</u> DOL1 ₂	Pearson Correlation	-.163	.171	1	-.247	.166
	p	.757	.512		.340	.790
	N	6	17	17	17	5
<u>sNGAL</u> DOL1 ₂	Pearson Correlation	-.026	.164	-.247	1	.228
	p	.922	.101	.340		.378
	N	17	101	17	103	17
<u>uNGAL</u> DOL1 ₂	Pearson Correlation	.090	.139	.166	.228	1
	p	.848	.595	.790	.378	
	N	7	17	5	17	17

*. Correlation is significant at the 0.05 level

**. Correlation is significant at the 0.01 level

U Tabeli 6 prikazane su korelacije KIM1 prvom danu drugi sat ispitivanja DOL1₂, najranija tačka merenja biomarkera (DOL1₂) i korelacije između izmerenih vrednosti pojedinih biomarkera u toj tački pokazane su na Tabeli 6.

Korelacije su izračunate između sledećih biomarkera merenih u DOL1₂: KIM1, CysC, uNGALa [apsolutne vrednosti u (ng/ml)], sNGAL, uNGAL standardizovane vrednosti u (ng/mg uCr)].

Tabela 21. Korelacije između svih urinarnih biomarkera merenih u četvrtom satu prvog dana

BIOMARKERI		KIM1 DAN1 ₄	sCysC DAN1 ₄	uNGALa DAN1 ₄	sNGAL DAN1 ₄	uNGAL DAN1 ₄
KIM1 DAN1 ₄	Pearson Correlation	1	.063	.258*	.418**	.238*
	p		.518	.012	.000	.019
	N	106	106	95	106	96
sCysC DAN1 ₄	Pearson Correlation	.063	1	.128	.227*	.158
	p	.518		.211	.018	.120
	N	106	108	97	108	98
uNGALa DAN1 ₄	Pearson Correlation	.258*	.128	1	.410**	.986**
	p	.012	.211		.000	.000
	N	95	97	97	97	97
sNGAL DAN1 ₄	Pearson Correlation	.418**	.227*	.410**	1	.395**
	p	.000	.018	.000		.000
	N	106	108	97	108	98
uNGAL DAN1 ₄	Pearson Correlation	.238*	.158	.986**	.395**	1
	p	.019	.120	.000	.000	
	N	96	98	97	98	98

*. Correlation is significant at the 0.05 level

**. Correlation is significant at the 0.01 level

U Tabeli 21. prikazane su korelacije KIM1 u četvrtom satu prvog dana merenja (DAN1₄) kada je KIM1 je imao pozitivnu statistički značajnu korelaciju sa uNGALa, p=0.012; sNGAL p=0.000 i uNGAL p=0.019.

Tabela 22. Korelacije između svih urinarnih biomarkera merenih u šestom satu prvog dana ispitivanja DAN₁₆

BIOMARKERI		KIM1	sCysC	uNGALa	sNGAL	uNGAL
		DAN ₁₆	DAN ₁₆	DAN ₁₆	DAN ₁₆	DAN ₁₆
<u>KIM1DAN₁₆</u>	Pearson Correlation	1	.098	.233	.367**	.346*
	p		.497	.128	.009	.020
	N	51	50	44	49	45
<u>sCysCDAN₁₆</u>	Pearson Correlation	.098	1	.088	.132	.145
	p	.497		.501	.178	.268
	N	50	106	60	105	60
<u>uNGALa DAN₁₆</u>	Pearson Correlation	.233	.088	1	.139	.396**
	p	.128	.501		.288	.002
	N	44	60	62	60	56
<u>sNGALDAN₁₆</u>	Pearson Correlation	.367**	.132	.139	1	.484**
	p	.009	.178	.288		.000
	N	49	105	60	106	60
<u>uNGALDAN₁₆</u>	Pearson Correlation	.346*	.145	.396**	.484**	1
	p	.020	.268	.002	.000	
	N	45	60	56	60	62

** . Correlation is significant at the 0.01 level

* . Correlation is significant at the 0.05 level

U Tabeli 8 prikazane su korelacije KIM1 u šestom satu prvog dana ispitivanja (DAN₁₆), KIM1 je imao statistički značajnu korelaciju sa sNGAL p=0.009, i uNGAL p=0.020.

Tabela 23. Korelacije između svih urinarnih biomarkera merenih u trećem danu ispitivanja DAN3

BIOMARKERI		KIM1	sCysC	uNGALa	sNGAL	uNGAL
		DAN3	DAN3	DAN3	DAN3	DAN3
<u>KIM1DAN3</u>	Pearson Correlation	1	.209*	.002	.213	.024*
	p		.032	.985	.029	.810
	N	105	105	99	105	99
<u>sCysCDAN3</u>	Pearson Correlation	.209*	1	.169	.142*	.183
	p	.032		.093	.143	.068
	N	105	108	100	107	100
<u>uNGALa DAN3</u>	Pearson Correlation	.002	.169	1	.300	.983
	p	.985	.093		.002	.002
	N	99	100	100	100	100
<u>sNGALDAN3</u>	Pearson Correlation	.213**	.142	.300**	1 *	.272
	p	.029	.143	.002		.006
	N	105	107	100	107	100
<u>uNGALDAN3</u>	Pearson Correlation	.024	.183	.983**	.272	1
	p	.810	.068	.000	.006	
	N	99	100	100	100	100

*. Correlation is significant at the 0.05 level

** . Correlation is significant at the 0.01 level

U tabeli 23. prikazane su korelacije KIM1 u trećem danu ispitivanja DAN3, KIM1 je imao pozitivnu korelaciju sa sCysC $p=0.032$; i sNGALa $p=0.029$

Tabela 24. Korelacije između svih urinarnih biomarkera merenih u sedmom danu ispitivanja DAN7

BIOMARKER		KIM1	sCysC	uNGALa	sNGAL	uNGAL
		DAN7	DAN7	DAN7	DAN7	DAN7
<u>KIM1DAN7</u>	Pearson Correlation	1.000	.254**	.049	.246	.079**
	p	.	.010	.628	.013	.435
	N	102	102	100	102	100
<u>sCysCDAN7</u>	Pearson Correlation	.254**	1.000	.235*	.127**	.236
	p	.010	.	.016	.193	.015
	N	102	108	105	107	105
<u>uNGALa DAN7</u>	Pearson Correlation	.049	.235*	1.000	.185	.984*
	p	.628	.016	.	.059	.000
	N	100	105	105	105	105
<u>sNGALDAN7</u>	Pearson Correlation	.246*	.127	.185	1.000*	.197
	p	.013	.193	.059	.	.044
	N	102	107	105	107	105
<u>uNGALDAN7</u>	Pearson Correlation	.079	.236*	.984**	.197	1.000*
	p	.435	.015	.000	.044	.
	N	100	105	105	105	105

*. Correlation is significant at the 0.05 level

** . Correlation is significant at the 0.01 level

U Tabeli 24 prikazane su korelacije KIM1 u sedmom danu ispitivanja (DAN7), KIM1 je imao pozitivnu korelaciju sa sCysC p=0.010, sNGAL p=0.013.

4.1.1.6. Alfa-1 mikroglobulin (α 1-M)

Tabela 25. α 1-MIKROGLOBULIN (pg/ml) u preterminske novorođenčadi po grupama: ne-AKI/ AKIN1/AKIN2

α 1- MIKRO	nonAKI	AKI	p	AKIN₁	AKIN₂	p
DAN₁ 2h – n; mean±SD	5 56.68 ± 33.92	13 56.94 ± 30.41	0.987	13 56.94 ± 30.41	nm	
DAN₁ 4h – n; mean±SD	35 33.23 ± 16.61	73 39.33 ± 16.77	0.079	61 40.63 ± 16.67	12 32.71 ± 16.36	0.070
DAN₁ 6h – n; mean±SD	6 36.90 ± 15.90	13 42.96 ± 18.52	0.499	13 42.96 ± 18.52	nm	
DAN₃ –n; mean±SD	35 28.85 ± 14.67	73 34.02 ± 14.53	0.087	61 34.47 ± 14.53	12 31.75 ± 14.96	0.197
DAN₇ –n; mean±SD	11 24.20 ± 11.37	20 32.22 ± 14.91	0.132	20 32.22 ± 14.91	nm	

DAN=dan života, AKI: Acute kidney injury, ne-AKI: without AKI, α 1-MIKRO : alfa 1 mikroglobulin (pg/ml), AKIN klasifikacija Acute Kidney Injury Network; AKIN1: Stepen 1 u r AKIN klasifikaciji; AKIN2: Stpene2 uAKIN klasifikaciji

U Tabeli 25. pokazane su vrednosti α 1-MIKROGLOBULINA u svim tačkama merenja, po grupama ne-AKI/AKIN1/AKIN2.

ANOVA-Fišerova jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima

Fišerova jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima analizira promenu vrednosti α 1-MIKROGLOBULINA u vremenu, različitim tačkama merenja, i značajnost te promene u različitim AKI kategorijama. Tabela 25 i Figura 24. (a,b,c,). ANOVA pokazuje da se vrednosti α 1-MIKRO značajno menjaju kroz vreme u svih ispitanika i različito u različitim grupama: AKI i ne-AKI, AKIN1 i AKIN2 i ne-AKI, AKIN1 i AKIN2.

Figura 1(a,b,c):Horizontalna analiza: prikazana je promena $\alpha 1$ -MIKRO u dve tačke merenja DAN1₄ i DAN3 ispitivana po grupama:

a): Prikazuje promenu vrednosti $\alpha 1$ -MIKRO izmerene u dve tačke merenja DAN1₄ (p=0.070) i DAN3 (p=1.652), u sve ispitivane novorođenčadi podeljene u dve osnovne grupe ispitanika ne-AKI i AKI. Pokazuje da se izmerene vrednosti $\alpha 1$ -MIKRO značajno razlikuju u dve tačke merenja prvog dana, četvrti sat (DAN1₄) i trećeg dana (DAN3) ali da ta razlika u dve osnovne grupe ispitanika non-AKI i AKI nije statistički značajna. F= 3.561, p=0.062. Tabela 25. Figura 24(a).

b) Prikazuje promenu vrednosti $\alpha 1$ -MIKRO u ispitanika koji su razvili AKI podeljenih u dve podgrupe AKIN1 i AKIN2 , u dve tačaka merenja. Vrednosti rano rastu u prvom danu ispitivanja, u obe grupe ispitanika, ta razlika je nije statistički značajna među grupama AKIN1 i AKIN2 u DAN1₄, p=0.007; Tabela 2. Analiza kroz vreme pokazuje da među grupama nema statistički značajnih razlika. F=1.379, p=0.244; Tabela 25. Figura 24(b).

c) Prikazuje promenu $\alpha 1$ -MIKRO u svih ispitanika podeljenih u non-AKI, AKIN1 i AKIN2 p u dve tačke merenja DAN1₄ (p=0.136) i DAN3(p=0.558); Tabela 25. Početne razlike u vrednostima statistički nisu značajne između ispitivanih grupa, kao ni njihova promena u vremenu. F=2.460, p=0.090. Tabela 25 Figura 24(c).

- a) [ne-AKI i AKI (F= 3.561; p=0.062)].
- b) [AKIN1 i AKIN2 (F=1.379, p=0.244)].
- c) [ne-AKI / AKIN1/ AKIN2 (F=2.460, p=0.090)].

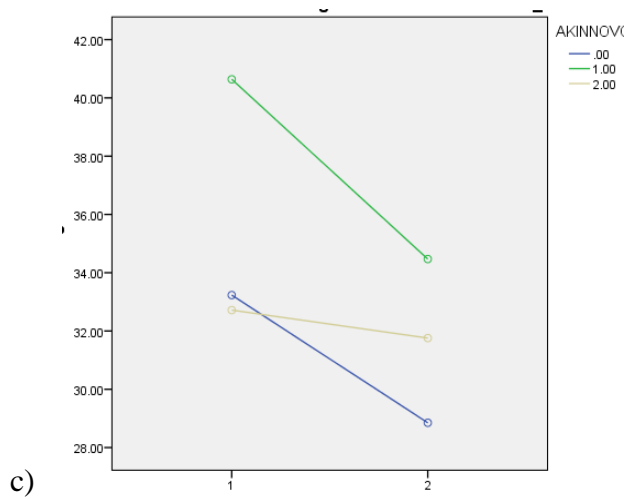
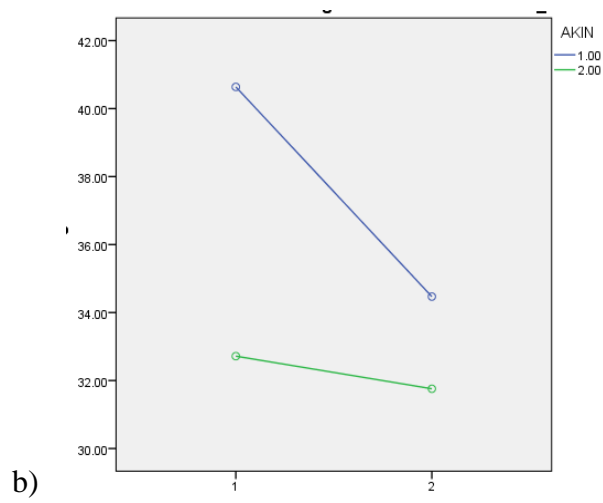
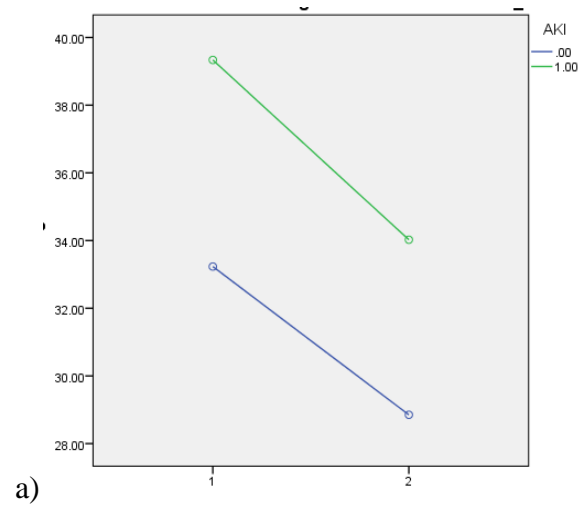


Figura 24.(a,b,c) Promene vrednoati $\alpha 1-M$, po grupama: ne-AKI/AKI/AKIN1/AKIN2

AUC-ROC

Tabela 26. Dijagnostičke karakteristike urinarnog α 1-MIKRO kao biomarkera akutnog oštećenja bubrega po AKIN klasifikaciji u svim vremenima

	BIOMARKERS Predictorske variable	n	AUC	95% CI	p	Optimal cutoff value	Sensitivity (%)	Specifiy (%)	LR+	LR-
non-AKI vs. AKI	α 1-M, DAN ₁₂	13	0.47	0.16- 0.78	0.882	57.7	71.43	100.0		0.29
	α 1-M, DAN ₁₄	73	0.60	0.49 -0.71	0.083	54.9	63.79	70.00	2.13	0.52
	α 1-M, DAN ₁₆	13	0.63	0.38 -0.88	0.357	876.0	38.70	100.0	7.47	0.57
	α 1-M, DAN ₃	73	0.61	0.50 -0.72	0.057	765.32	27.8	90.90	4.17	0.75
	α 1-M, DAN ₇	20	0.65	0.45 -0.85	0.167	242.4	57.7	57.60	1.33	0.72
AKIN ₁ vs. AKIN 2	α 1-M, DAN ₁₂	nm								nm
	α 1-M, DAN ₁₄	12	0.38	0.20 -0.55	0.208	548.11	91.7	67.6	1.66	0.42
	α 1-M, DAN ₁₆	nm				780.26	75.0	89.2	2.00	0.50
	α 1-M, DAN ₃	12	0.46	0.28 -0.65	0.710	432.2	58.3	58.2	1.81	0.49
	α 1-M, DAN ₇	Nm				98	50.00	73.1	2.12	0.65

ALFA- 1 MIKROGLOBULIN (α 1-M): pg/ml; DAN života; CI Interval poverenja; LR+ Likelihood ratio positive; LR- Likelihood ratio negative; AUC: area under the receiver-operating-characteristic curve

Najveću sposobnost predviđanja AKI za α 1-MIKROGLOBULINA imao je AUC u AKI grupi u DAN₁₆ iznosio je AUC = 0.63[95%(0.38-0.88)] p=0.357. Međutim mali broj uzoraka samo 13 umanjuje značaj ovog rezultata. Dobar AUC-ROC beleži se i u DOL7: AUC = 0.65[95%(0.45-0.85)] p=0.167. Za celu prvu nedelju u AKI grupi AUC-ROC je iznosio preko 60: DAN₁₄ = 0.60[95%(0.49-0.71)] p=0.083; DAN₁₆ = 0.63[95%(0.38-0.88)] p=0.357; DAN₃ = 0.61[95%(0.50-0.72)] p=0.057; DAN₇ = 0.65[95%(0.45-0.85)] p=0.167.

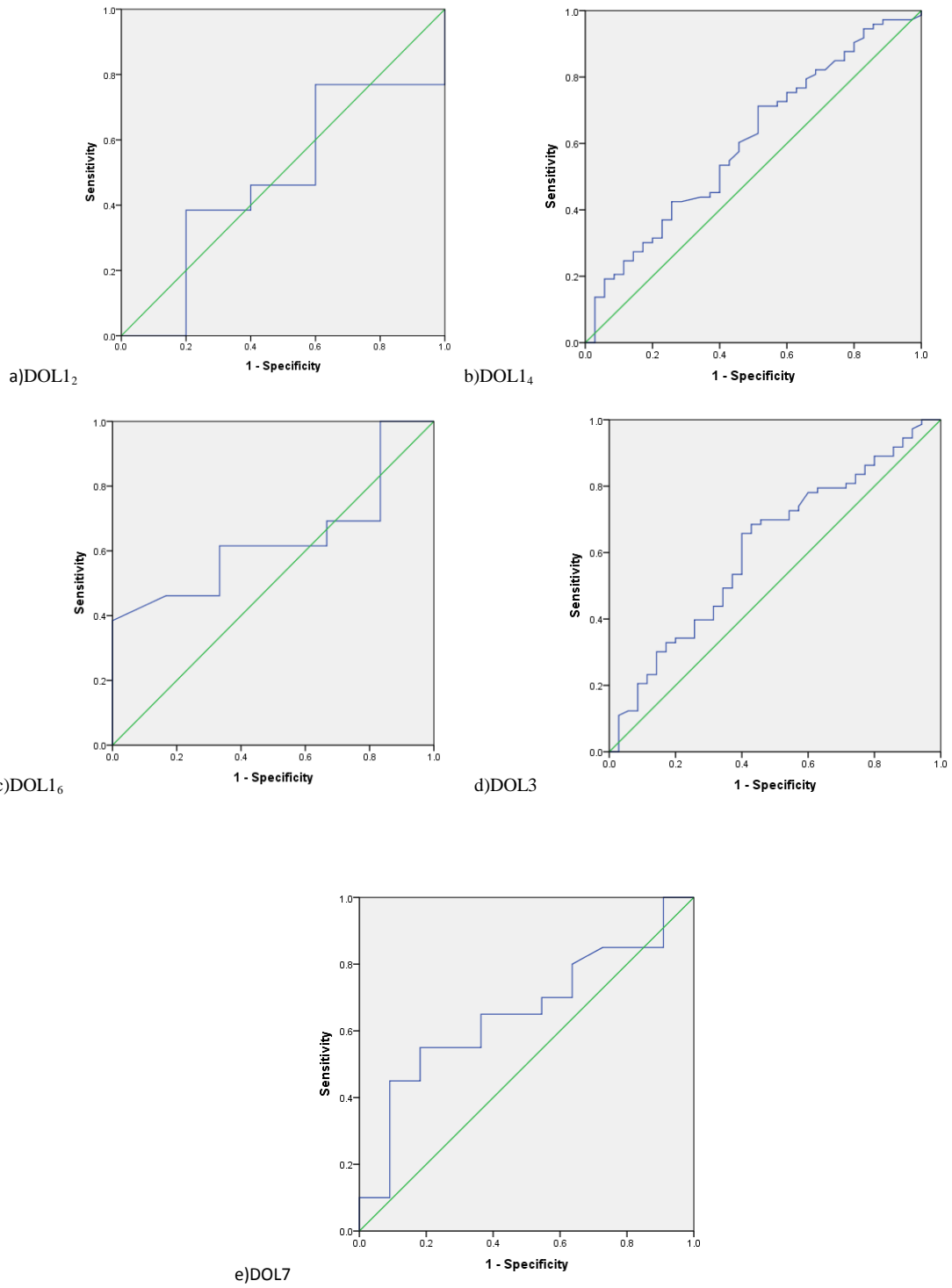
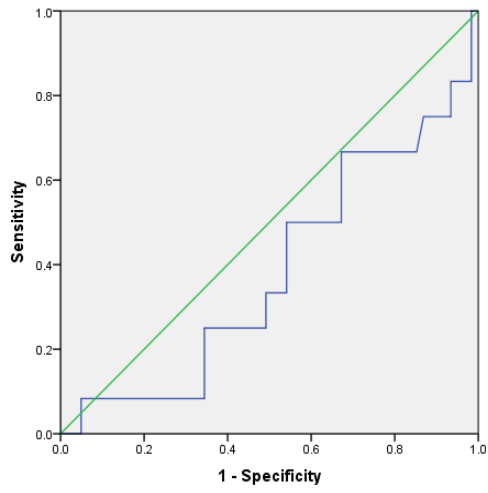
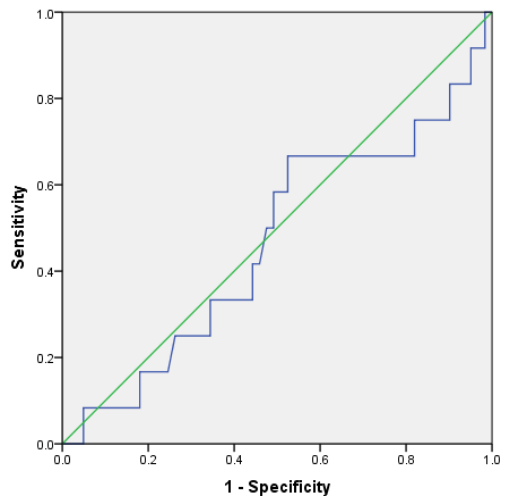


Figure 25: AUC ROC by AKI



a) DOL14



b) DOL3

Figure 26. AUC-ROC by AKINI

Tabela 27. Logistička regresiona analiza riziko faktora za razvoj:

AKI/AKIN1/AKIN2: (α 1-MIKRO)

	Riziko k faktori	OR	95% CI	p	Adjusted a OR	95% CI	p
AKI vs. non-AKI	POL	1.335	0.537-3.322	0.534			
	Gestacija (nedelje)	0.780	0.563-1.082	0.137			
	Apgar score 5 min.	0.828	0.606-1.132	0.238			
	porodajna telesna masa,g	1.000	0.999-1.001	0.952			
	Basedeficit (mmol/L)	0.871	0.733-1.034	0.0114			
	α 1-M, DAN ₁₂	nm					
	α 1-M, DAN ₁₄	1.002	1.001-1.003	0.002 [*]	1.015	0.988-1.043	0.278
	α 1-M, DAN ₁₆	nm					
	α 1-M, DAN ₃	1.026	1.996-1.058	0.091	1.017	0.985-1.050	0.298
	α 1-M, DAN ₇	nm					
AKIN2 vs. AKIN1	Pol (muški)	0.788	0.176-3.527	0.755			
	Gestacija (nedelje)	0.853	0.457-1.598	0.618			
	Apgar score 5 min.	1.683	0.917-3.087	0.930			
	porodajna telesna masa, g	1.000	0.998-1.002	0.7 27			
	Basedeficit (mmol/L)	0.619	0.445-0.861	0.004 [*]			
	α 1-M, DAN ₁₂	nm					
	α 1-M, DAN ₁₄	0.970	0.931-1.010	0.140	0.956	0.906-1.010	0.106
	α 1-M, DAN ₁₆	nm					
	α 1-M, DAN ₃	0.987	0.944-1.032	0.553	0.970	0.915-1.028	0.297
	α 1-M, DAN ₇	nm					

CI:Interval poverenja; OR:odds ratio;^aAdjusted for:(pol, gestacija, 5-min Apgar score, porodajnu telesnu masu, basedeficit)

U tabeli 27 su sumirane univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza. Rizik od AKI je progresivno rastao kako je α 1-Mikroglobulin progresivno rastao po prijemu u NICU: OR =1.002 sa 95% CI(1.001-1.003), kao i u trećem danu OR=1.026 sa 95% CI (1.996-1.058). Nakon ađastiranja ovaj marker je bio značajan marker AKI u AKI grupi u DAN₁₄. OR=1.015 sa 95%CI(0.988-1.043). U ostalim grupama i ostalim vremenima ovaj marker nije bio značajan biomarker AKI niti sam niti ađastiran.

Tabela 28. Korelacije vrednosti istog biomarkera $\alpha 1$ -MIKROGLOBULINA u različitim vremenima

BIOMARKER		$\alpha 1$ -M, DAN1 ₂	$\alpha 1$ -M, DAN1 ₄	$\alpha 1$ -M, DAN1 ₆	$\alpha 1$ -M, DAN3	$\alpha 1$ -M, DAN7
$\alpha 1$ -M, DAN1 ₂	Pearson Correlation	1	.643 ^{**}	.564 [*]	.564 [*]	.343
	p		.004	.015	.015	.163
	N	18	18	18	18	18
$\alpha 1$ -M, DAN1 ₄	Pearson Correlation	.643 ^{**}	1	.281	.731 ^{**}	.190 ^{**}
	p	.004		.243	.000	.307
	N	18	108	19	108	31
$\alpha 1$ -M, DAN1 ₆	Pearson Correlation	.564 [*]	.281	1	.877 ^{**}	.555 [*]
	p	.015	.243		.000	.017
	N	18	19	19	19	18
$\alpha 1$ -M, DAN3	Pearson Correlation	.564 [*]	.731 ^{**}	.877 ^{**}	1	.523 [*]
	p	.015	.000	.000		.003
	N	18	108	19	108	31
$\alpha 1$ -M, DAN7	Pearson Correlation	.343	.190	.555 [*]	.523 ^{**}	1
	p	.163	.307	.017	.003	
	N	18	31	18	31	31

$\alpha 1$ -mikroglobulin u svim vremenskim tačkama merenja je bio u značajnoj korelaciji sa vrednostima $\alpha 1$ -mikroglobulina u DAN1₄, DAN₆, DAN3 sa koeficijentom korelacije (r) u rasponu od 0.564-0.643.

Tabela 29. Korelacije α 1-M sa ostalim biomarkerima u DAN1₂

BIOMARKER		α 1-M DAN1 ₂	uKIM1 DAN1 ₂	sCysC DAN1 ₂	uNGALaps DAN1 ₂	sNGAL DAN1 ₂	uNGAL1 ₂ DAN1 ₂
α1-M, DAN1₂	Pearson Correlation	1	.265	-.082	-.194	-.171	.686
	p		.322	.746	.713	.497	.089
	N	18	16	18	6	18	7
uKIM1, DAN1₂	Pearson Correlation	.265	1	-.247	-.163	-.026	.090
	p	.322		.340	.757	.922	.848
	N	16	17	17	6	17	7
sCysC, DAN1₂	Pearson Correlation	-.082	-.247	1	.171	.164	.139
	p	.746	.340		.512	.101	.595
	N	18	17	106	17	101	17
uNGALaps, DAN1₂	Pearson Correlation	-.194	-.163	.171	1	-.247	.166
	p	.713	.757	.512		.340	.790
	N	6	6	17	17	17	5
sNGAL, DAN1₂	Pearson Correlation	-.171	-.026	.164	-.247	1	.228
	p	.497	.922	.101	.340		.378
	N	18	17	101	17	103	17
uNGAL, DAN1₂	Pearson Correlation	.686	.090	.139	.166	.228	1
	p	.089	.848	.595	.790	.378	
	N	7	7	17	5	17	17

U najranijoj tački merenja; drugi sat prvog dana (DAN1₂) α 1-mikroglobulin je bio u značajnoj korelaciji sa ostalim biomarkerima: KIM1, r=0.265; sNGAL, r=0.686.

Tabela 30. Korelacije α 1-M sa ostalim biomarkerima u DAN1₄

BIOMARKER		α 1-M DAN1 ₄	uKIM-1 DAN1 ₄	sCysC DAN1 ₄	uNGALaps DAN1 ₄	sNGAL DAN1 ₄	uNGAL DAN1 ₄
α 1-M DAN1 ₄	Pearson Correlation	1	-.002	-.140	.081	.046	.070
	p		.988	.148	.428	.634	.494
	N	108	106	108	97	108	98
uKIM1DAN1 ₄	Pearson Correlation	-.002	1	.063	.258 [*]	.418 ^{**}	.238
	p	.988		.518	.012	.000	.019
	N	106	106	106	95	106	96
sCysCDAN1 ₄	Pearson Correlation	-.140	.063	1	.128	.227 [*]	.158
	p	.148	.518		.211	.018	.120
	N	108	106	108	97	108	98
uNGALapsDAN1 ₄	Pearson Correlation	.081	.258 [*]	.128	1	.410 ^{**}	.986
	p	.428	.012	.211		.000	.000
	N	97	95	97	97	97	97
sNGAL DAN1 ₄	Pearson Correlation	.046	.418 ^{**}	.227 [*]	.410 ^{**}	1	.395
	p	.634	.000	.018	.000		.000
	N	108	106	108	97	108	98
uNGALDAN1 ₄	Pearson Correlation	.070	.238 [*]	.158	.986 ^{**}	.395 ^{**}	1
	p	.494	.019	.120	.000	.000	
	N	98	96	98	97	98	98

U prvom danu, četvrti sat merenja (DAN1₄) α 1-mikroglobulin je bio u značajnoj korelaciji sa ostalim biomarkerima; sNGAL, r=0.046; uNGAL, r=0.070.

Tabela 31. Korelacije α 1-M sa ostalim biomarkerima u DAN1₆

BIOMARKER		α 1-M	uKIM1	sCysC	uNGALaps	sNGAL	uNGAL
		DAN1 ₆	DAN1 ₆	DAN1 ₆	DAN1 ₆	DAN1 ₆	DAN1 ₆
α 1-M, DAN1 ₆	Pearson Correlation	1	.136	-.143	-.426	-.452	-.254
	P		.591	.559	.088	.052	.295
	N	19	18	19	17	19	19
uKIM1, DAN1 ₆	Pearson Correlation	.136	1	.098	.233	.367**	.346
	p	.591		.497	.128	.009	.020
	N	18	51	50	44	49	45
sCysC, DAN1 ₆	Pearson Correlation	-.143	.098	1	.088	.132	.145
	p	.559	.497		.501	.178	.268
	N	19	50	106	60	105	60
uNGAL _{aps} , DAN1 ₆	Pearson Correlation	-.426	.233	.088	1	.139	.396
	p	.088	.128	.501		.288	.002
	N	17	44	60	62	60	56
sNGAL, DAN1 ₆	Pearson Correlation	-.452	.367**	.132	.139	1	.484
	p	.052	.009	.178	.288		.000
	N	19	49	105	60	106	60
uNGAL, DAN1 ₆	Pearson Correlation	-.254	.346*	.145	.396**	.484**	1
	Sig. (2-tailed)	.295	.020	.268	.002	.000	
	N	19	45	60	56	60	62

U prvom danu , šesti sat merenja (DAN1₆) α 1-mikroglobulin je bio u značajnoj korelaciji sa ostalim biomarkerima; KIM-1, r=0.136.

Tabela 32. Korelacije α 1-M sa ostalim biomarkerima u DAN3

BIOMARKER		α 1-M.	uKIM1	sCysC	uNGALaps	sNGAL	uNGAL
		DAN3	DAN3	DAN3	DAN3	DAN3	DAN3
α 1-M DAN3	Pearson Correlation	1	.095	-.138	.008	-.084	.020
	p		.336	.155	.939	.392	.844
	N	108	105	108	100	107	100
uKIM1 DAN3	Pearson Correlation	.095	1	.304**	-.011	.267	-.004
	p	.336		.002	.911	.006	.966
	N	105	105	105	99	105	99
sCysC DAN3	Pearson Correlation	-.138	.304**	1	.170	.164	.183**
	p	.155	.002		.091	.091	.069
	N	108	105	108	100	107	100
uNGALaps DAN3	Pearson Correlation	.008	-.011	.170	1	.268	.985
	p	.939	.911	.091		.007	.000
	N	100	99	100	100	100	100
sNGAANL3	Pearson Correlation	-.084	.267**	.164	.268**	1	.242**
	p	.392	.006	.091	.007		.015
	N	107	105	107	100	107	100
uNGALDAN3	Pearson Correlation	.020	-.004	.183	.985**	.242	1
	p	.844	.966	.069	.000	.015	
	N	100	99	100	100	100	100

U prvom danu , šesti sat merenja (DAN3) α 1-mikroglobulin je bio u značajnoj korelaciji sa ostalim biomarkerima; KIM1, $r=0.095$; uNGAL, $r=0.020$.

Tabela 33. Tabela 5. Korelacije α 1-M sa ostalim biomarkerima u DAN7

BIOMARKER		α 1-M DAN7	uKIM1 DAN7	Cys-C DAN7	uNGALaps DAN7	sNGAL DAN7	uNGAL DAN7
α 1-M DAN7	Pearson Correlation	1	-.166	.114	-.102	.143	-.074
	p		.379	.541	.584	.441	.691
	N	31	30	31	31	31	31
uKIM1 DAN	Pearson Correlation	-.166	1	.271**	.073	.272	.075
	p	.379		.006	.468	.006	.460
	N	30	102	102	100	102	100
sCysC DAN7	Pearson Correlation	.114	.271**	1	.278**	.160	.286**
	p	.541	.006		.004	.100	.003
	N	31	102	108	105	107	105
uNGALapsDAN7	Pearson Correlation	-.102	.073	.278**	1	.134	.970
	p	.584	.468	.004		.173	.000
	N	31	100	105	105	105	105
sNGALDAN7	Pearson Correlation	.143	.272**	.160	.134	1	.148**
	p	.441	.006	.100	.173		.133
	N	31	102	107	105	107	105
uNGAL	Pearson Correlation	-.074	.075	.286**	.970**	.148	1
	p	.691	.460	.003	.000	.133	
	N	31	100	105	105	105	105

U sedmom danu (DAN3) α 1-mikroglobulin je bio u značajnoj korelaciji sa ostalim biomarkerima; sCysC, $r=0.114$; sNGAL, $r=0.143$.

** . Correlation is significant at the 0.01 level (p).

4.1.1.7. Beta-2 mikroglobulin (β 2-M)

Tabela 34. β 2-MIKROGLOBULIN (pg/ml) u preterminske novorođenčadi u ne-AKI/AKIN1/AKIN2 grupama

β 2-MIKRO	nonAKI	AKI	p	AKIN ₁	AKIN ₂	p
DAN₁ 2h -n; mean \pm SD	35 7.48 \pm 6.58	73 8.23 \pm 4.99	0.679	22 8.12 \pm 5.08	1	0.653
DAN₁ 4h -n; mean \pm SD	19 8.73 \pm 5.56	23 8.34 \pm 3.91	0.795	22 8.15 \pm 3.89	1	0.277
DAN₁ 6h -n; mean \pm SD	35 8.84 \pm 5.42	73 10.12 \pm 5.50	0.259	61 9.44 \pm 5.49	12 13.57 \pm 4.24	0.016
DAN₃ -n; mean \pm SD	35 9.33 \pm 5.27	73 10.69 \pm 5.38	1.219	61 9.80 \pm 5.20	12 15.24 \pm 3.86	0.001
DAN₇ -n; mean \pm SD	35 7.65 \pm 5.11	72 9.06 \pm 4.81	0.168	60 8.32 \pm 4.58	12 12.75 \pm 4.37	0.003

DAN=dan života, AKI: Acute kidney injury, ne-AKI: bez AKI, β 2-MIKRO :beta 2 mikroglobulin (pg/ml), AKIN klasifikacija: Acute Kidney Injury Network; AKIN1: Stepen1 za AKIN klasifikaciju; AKIN2: Stepen 2 za AKIN klasifikaciju

U Tabeli 34. pokazane su vrednosti β 2-MIKRO u svim tačkama merenja, po grupama ne-AKI/AKIN1/AKIN2. Fišerova jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima Fišerova jednofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima analizira promenu vrednosti β 2-MIKRO u vremenu i značajnost te promene u različitim AKI kategorijama. Tabela 34 i Figura 27 (a,b,c,). ANOVA pokazuje da se vrednosti β 2-MIKRO značajno menjaju kroz vreme u svih ispitanika i različito u različitim grupama: AKI i non-AKI grupi, AKIN1 i AKIN2 i non-AKI, AKIN1 i AKIN2. Figura 27.(a,b,c,): Horizontalna analiza: promena β 2-MIKRO u tri tačke merenja DAN₁₆, DAN₃ i DAN₇ ispitivanja po grupama:

a) Prikazuje dve osnovne grupe ispitanika non-AKI i AKI i promene vrednosti β 2 mikroglobulina (β 2-M) u njima. Prikazana su merenja u tri tačke: DAN₁₆ (p=0.259) i DAN₃ (p=1.219) i DAN₇ (p=0.168). Pokazuje da se izmerene vrednosti β 2-MIKRO razlikuju u tri tačke merenja prvog, trećeg i sedmog dana dana ali da ta razlika u dve osnovne grupe ispitanika non-AKI i AKI nije bila statistički značajna. F= 1991, p=0.161. Tabela 34. Figura 27.(a).

b) Prikazuje svu novorođenčad koja su razvila AKI i podeljni su u dve podgrupe AKIN1 i AKIN2 i promene vrednosti β 2 mikroglobulina (β 2-M) u njima, mereno u tri tačke sa

statistički značajnim razlikama između grupa u navedenim tačkama merenja: DAN1₆; p=0.016, u DAN3 p=0.001 i DAN7 p=0.003. Promena vrednosti β 2-M u grupama pokazuje da su razlike kroz vreme u posmatranim grupama bile visoko statistički značajne F=9.664; p=0.003. Tabela 34. Figura 27(b).

c) Prikazuje promenu β 2-MIKRO u sve ispitivane novorođenčadi podeljenih u non-AKI, AKIN1 i AKIN2 pod-grupe, u tri tačke merenja: DAN1₆ (p=0.136); DAN3(p=0.558) i DOL7(p=0.003); Tabela 34. Razlike u vrednostima β 2-MIKRO koje su u grupama zabeležene u vremenu statistički su veoma značajne.

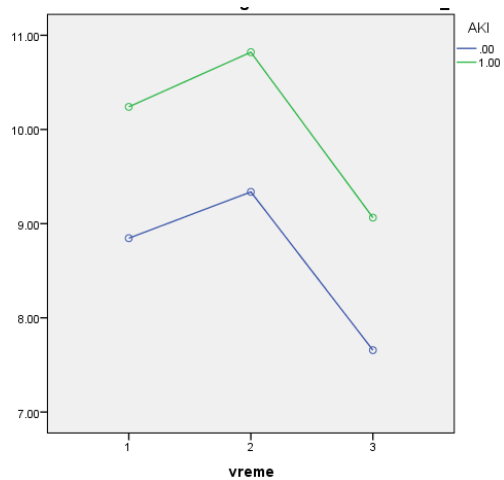
Tabela 34. Figura 27(c) F=5761, p=0.004.

Figura 27. (a,b,c): Horizontalna analiza: promena β 2-MIKRO u svih pet tačkama merenja po ispitivanim grupama:

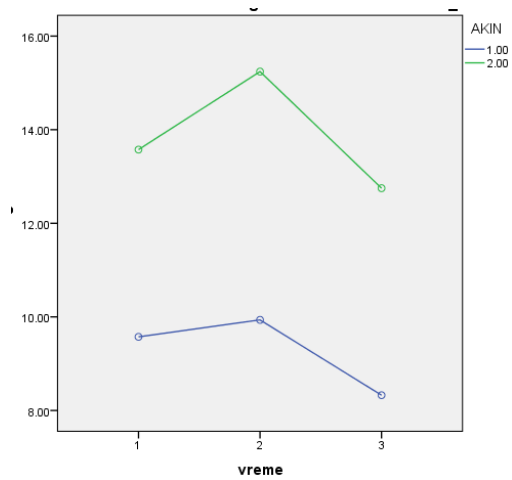
Figura 27(a) Prikazuje sve ispitanike u svim tačkama merenja. Ispitanici su podeljeni u dve osnovne grupe non-AKI i AKI. F=0.335, p=0.566.

Figura 27(b) Prikazuje ispitanike u AKIN1 i AKIN2 i analizu vrednosti β 2-M u svim tačkama ispitivanja. Ova analiza pokazuje da nema statistički značajnih razlika u vrednostima β 2-M u ispitivanim grupama. F=2931; p=0.102.

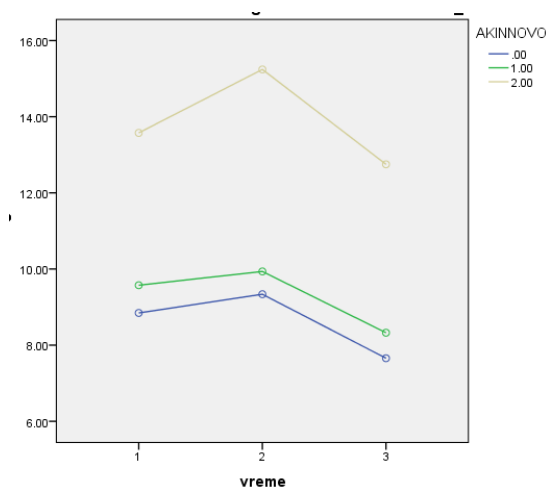
Figura 27(c) Prikazuje sve ispitanike u svim tačkama merenja i pokazuje da posmatrano u dužem vremenskom periodu nema statistički značajnih razlika među analiziranim grupama. F=1311; p= 0.281.



a) *ne-AKI/AKI*

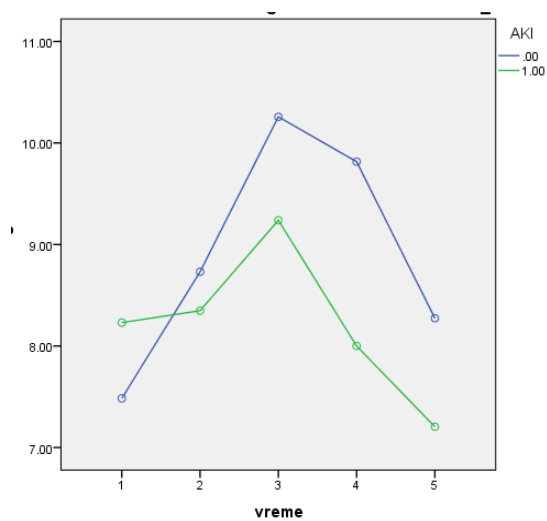


b) *AKIN1/AKIN2*

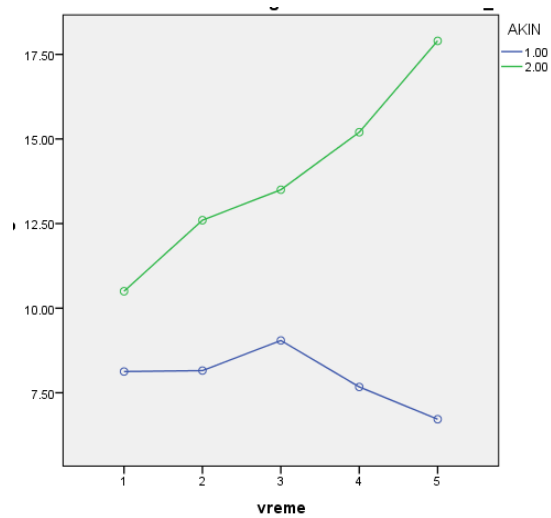


c) *ne-AKI/AKIN1/AKIN2*

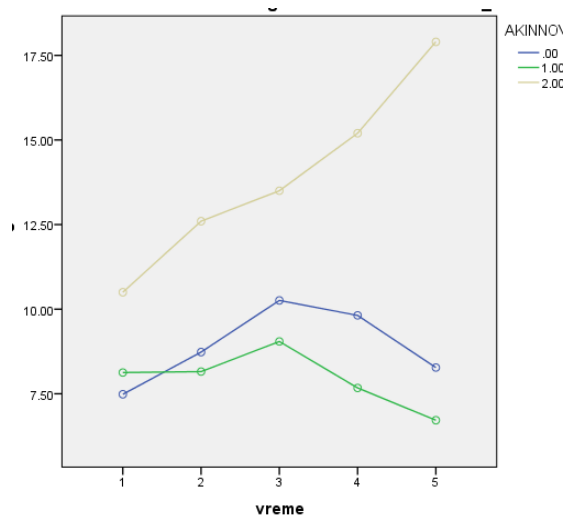
Figura 27. (a,b,c) Promene vrednosti $\beta 2$ -mikroglobulina u tri tačke merenja (DAN1₆, DAN3, DAN7) po grupama



a) ne-AKI/AKI



b) AKIN1/AKIN2



c) ne-AKI/AKIN1/AKIN2

Figura 28. (a,b,c): Promene vrednosti $\beta 2$ -mikroglobulina u u svih pet tačaka merenja po grupama

Table 35. Diagnostičke karakteristike urinarnog biomarkera β 2-MIKRO za AKI po AKIN klasifikaciji za sve vremenske tačke

	BIOMARKERS Predictorske variable	n	AUC	95% CI	p	Optimal cutoff value	Sensitivit y (%)	Specifičiy (%)	LR+	LR-
non- AKI vs. AKI	β 2-M, DAN1 ₂	23	0.59	0.41-0.77	0.300	57.7	71.43	100.0		0.29
	β 2-M, DAN1 ₄	23	0.52	0.34-0.70	0.771	54.9	63.79	70.00	2.13	0.52
	β 2-M, DAN1 ₆	73	0.56	0.38- 0.88	0.249	876.0	38.70	100.0	7.47	0.57
	β 2-M, DAN3	73	0.58	0.47 - 0.70	0.134	765.32	27.8	90.90	4.17	0.75
	β 2-M, DAN7	72	0.58	0.46 - 0.69	0.174	242.4	57.7	57.60	1.33	0.72
AKIN1 vs. AKIN 2	β 2-M, DAN1 ₂	1	0.72	0.54-0.91	0.541					
	β 2-M, DAN1 ₄	1	0.90	0.78- 1.00	0.175	548.11	91.7	67.6	1.66	0.42
	β 2-M, DAN1 ₆	12	0.74	0.61-0.88	0.007	780.26	75.0	89.2	2.00	0.50
	β 2-M, DAN3	12	0.80	0.67- 0.93	0.001	432.2	58.3	58.2	1.81	0.49
	β 2-M, DAN7	12	0.75	0.61-0.89	0.006	98	50.00	73.1	2.12	0.65

BETA 2 MIKROGLOBULIN (β 2-M): pg/ml; DAN: dan života; CI Interval poverenja; LR+ Likelihood ratio positive; LR- Likelihood ratio negative; AUC: area under the receiver-operating-characteristic curve

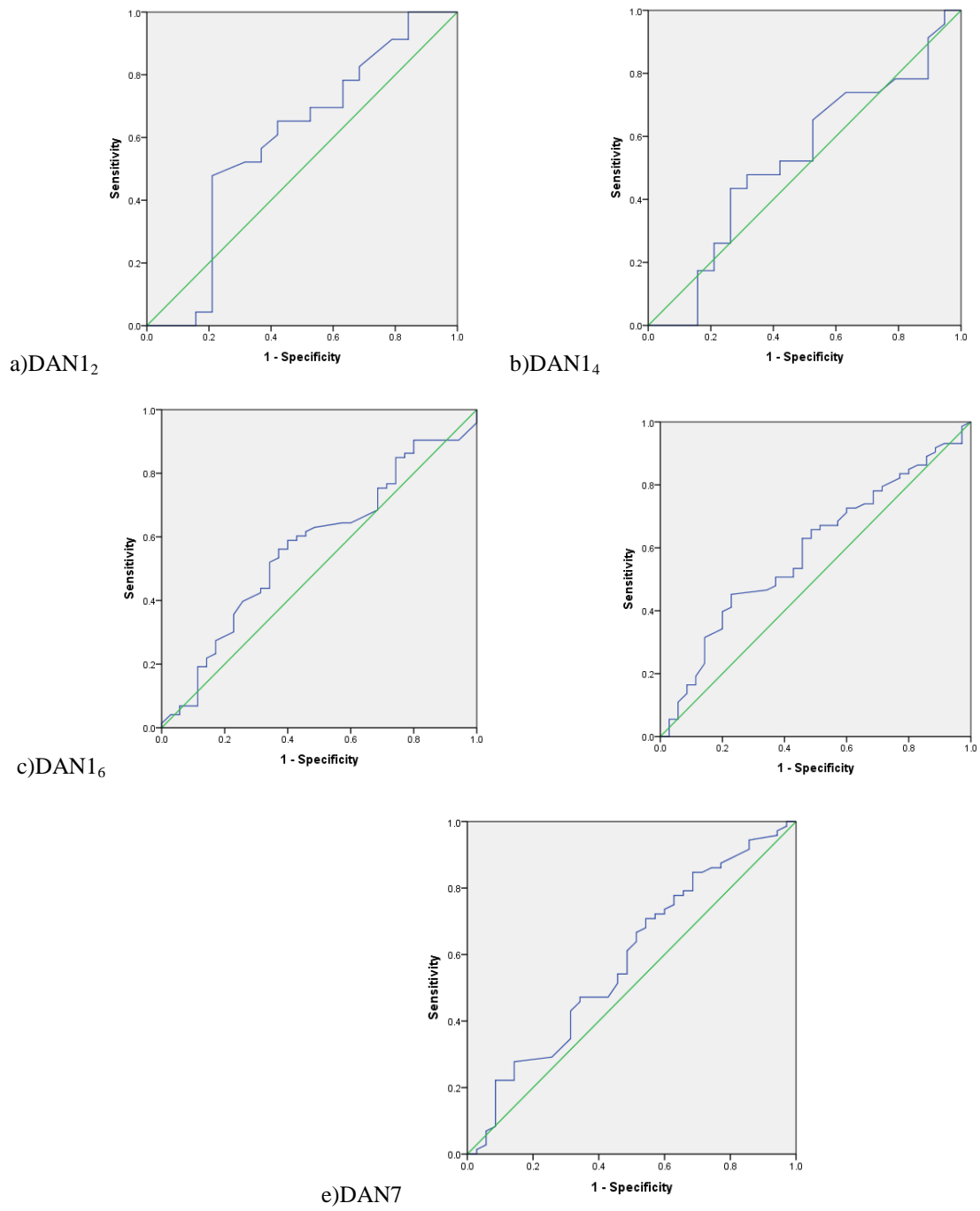


Figura 29. β 2-M, ROC krive za AKI

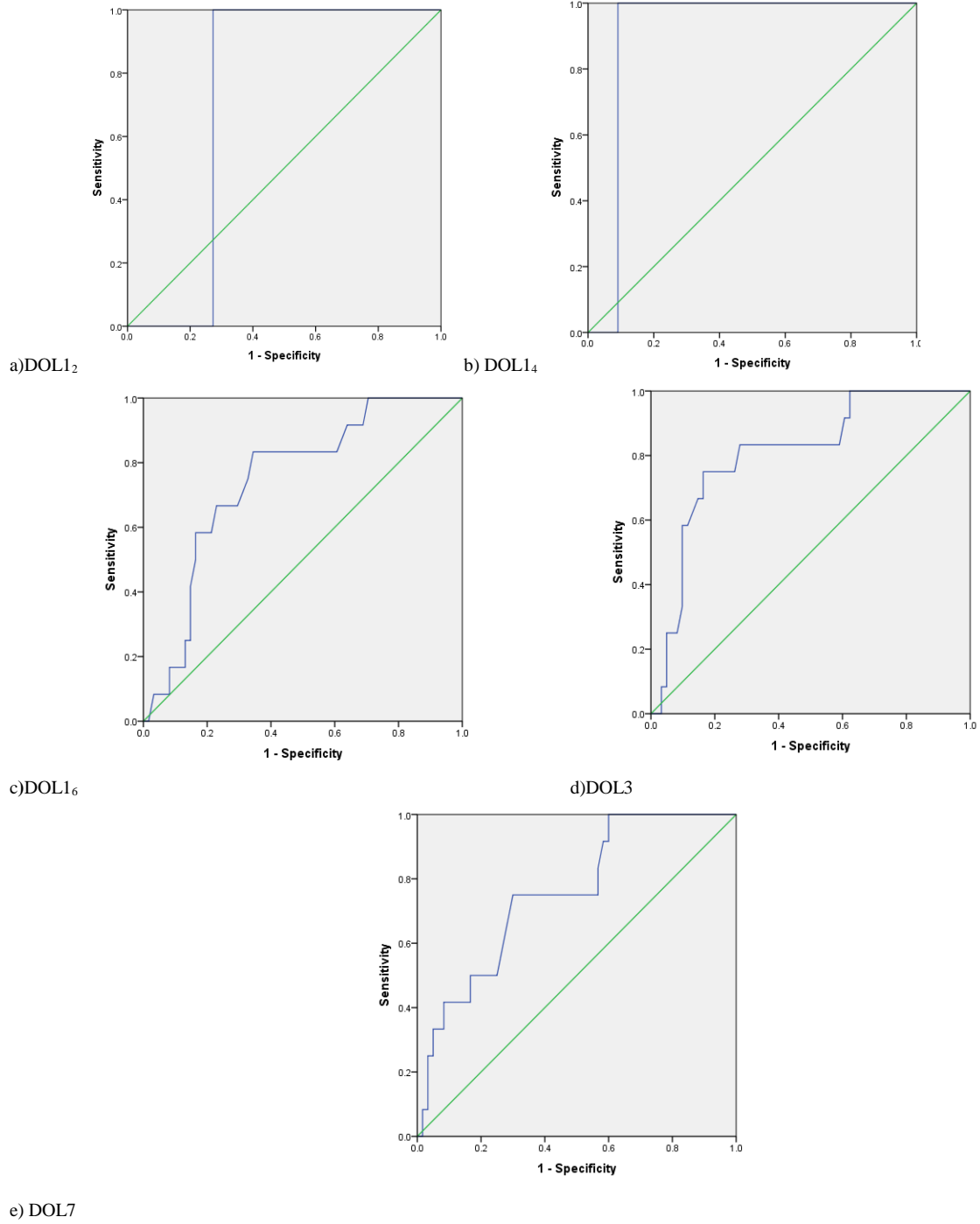


Figura 30. β_2 -M, ROC krive za AKINI

Tabela 35. Logistička regresiona analiza faktora rizika za razvoj akutnog oštećenja bubrega: AKI/AKIN, pomoću (β 2-MIKROGLOBULIN)

	Faktori rizika	OR	95% CI	p	Prilagodeno na ORp	95% CI	p
AKI vs. ne-AKI	Pol	1.337	0.288-6.204	0.711			
	Gestacija (nedelje)	0.696	0.422-1.148	0.155			
	Apgar score 5 min.	0.448	0.233-0.861	0.016			
	Porodajna telesna masa,g	1.001	0.999-1.003	0.494			
	Base deficit (mmol/L)	1.200	0.862-1.670	0.280			
	β 2-M, DAN ₂	1.024	0.918-1.142	0.670	1.008	0.875-1.160	0.915
	β 2-M, DAN ₄	0.982	1.861-1.120	0.789	1.014	0.857-1.201	0.697
	β 2-M, DAN ₆	1.045	0.968-1.128	0.257	1.020	0.939-1.108	0.641
	β 2-M, DAN ₃	1.050	0.971-1.135	0.219	1.020	0.735-1.049	0.662
	β 2-M, DAN ₇	1.062	1.975-1.157	0.168	1.025	0.934 1.125	0.604
AKIN2 vs. AKIN1	Pol	0.670	0.000	0.999			
	Gestacija (nedelje)	1.125	0.000	1.000			
	Apgar score 5 min.	0.000	0.000	0.999			
	Porodajna telesna masa,g	1.022	0.000	1.000			
	Base deficit (mmol/L)	0.073	0.000	1.000			
	β 2-M, DAN ₂	1.095	0.747-1.604	0.643	0.367	0.000	1.000
	β 2-M, DAN ₄	1.270	0.805-2.003	0.304	5.526	0.000	0.999
	β 2-M, DAN ₆	1.155	1.020-1.309	0.023	1.188	1.006-1.401	0.042
	β 2-M, DAN ₃	1.256	1.077-1.465	0.004	1.256	1.047-1.507	0.014
	β 2-M, DAN ₇	1.234	1.060-1.437	0.007	1.235	1.031-1.479	0.022

CI: interval poverenja; OR^P:odnos šansi prilagodeni na (pol, gestacionu zrelost, 5-min Apgar skor, porodajna telesna masa, deficit baze)

U tabeli 35. su sumirane univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza. Rizik od AKI porastao je rano sa porastom koncentracija β 2-M, DAN₁₄ u 2 i 6 satu po prijemu u NICU: OR=1.024 sa 95%CI=(0.918-1.142); OR=1.045 sa 95%CI=(0.968-1.128); tim redom kao i u trećem OR=1.050 sa 95%CI=(0.971-1.135) i sedmom danu života OR=1.062 sa 95%CI=(0.975-1.157) u AKI grupi ispitanika. U AKIN2 grupi visoke vrednosti β 2-M, bile su značajni prediktori AKI u svim tačkama ispitivanja DAN₁₂: OR=1.095 sa 95%CI=(0.747-1.601), DAN₁₄ OR=1.270 sa 95%CI=(0.805-2.030), DAN₁₆ OR=1.155 sa 95%CI=(1.020-1.309), DAN₃ OR=1.256 sa 95%CI=(1.077-1.465), i DAN₇ OR=1.234 sa 95%CI=(1.060-1.437). Multivarijantna logistička regresiona analiza je otkrila da su visoke vrednosti β 2-M, u svim tačkama ispitivanja na dalje bile značajni prediktori AKI nakon prilagođavanja, "ađastiranja", na pridružene varijable: DAN₁₂ OR=1.008 sa 95% CI=(0.875-1.160); DAN₁₄ OR=1.014 sa 95%CI=(0.857-1.201); DAN₁₆ OR=1.020 sa 95%CI=(1.939-1.108); DAN₃ OR=1.008 sa 95% CI=(0.875-1.160); DAN₇ OR=1.014 sa 95%CI=(0.857-1.201); tim redom u AKI grupi i takođe u AKIN 2 grupi ispitanika u četiri tačke ispitivanja od četvrtog sata na dalje: DAN₁₄ OR=5.526 sa 95%CI=(0.000-...); DAN₁₆ OR=1.188 sa 95%CI=(1.006-1.401); DAN₃ OR=1.256 sa 95% CI=(1.047-1.507); DAN₇ OR=1.235 sa 95%CI=(1.031-1.479).

KORELACIJE: Povezanost između vrednosti istog biomarkera merenog u različitim vremenima izračunata je pomoću Pirsonovog koeficijenta linearne korelacije.

Tabela 36

BIOMARKERI		β 2-M	β 2-M	β 2-M	β 2-M	β 2-M
		DAN1 ₂	DAN1 ₄	DAN1 ₆	DAN3	DAN
U β 2-M, DOL1 ₂	Pearson Correlation	1	.684**	.512**		
	p		.000	.001	.276	.381**
	N	42	42	42	.077	.013
u β 2- M, DOL1 ₄	Pearson Correlation	.684**	1	.713**	.42	.42
	p	.000		.000	.266**	.354
	N	42	42	42	.089	.021
u β 2-M, DOL1 ₆	Pearson Correlation	.512**	.713**	1	.42	.42
	p	.001	.000		.831**	.772**
	N	42	42	108	.000	.000
u β 2-M,DOL3	Pearson Correlation	.276	.266	.831**	108	107
	p	.077	.089	.000	1	.898
	N	42	42	108	108	.000
u β 2-M,DOL7	Pearson Correlation	.381*	.354*	.772**	.988*	107
	p	.013	.021	.000	.000	1*
	N	42	42	107	107	107

β 2-mikroglobulin u svim vremenskim tačkama merenja je bio u značajnoj korelaciji sa vrednostima β 2-mikroglobulina u DAN1₄, DAN1₆, DAN3 sa koeficijentom korelacije (r) u rasponu od 0.512-0.988.

Tabela 37. Korelacije β 2-M sa ostalim biomarkerima u DAN1₂

BIOMARKER		β 2-M	α 1-M	uKIM1	sCysC	uNGALaps	sNGAL	uNGAL
		DAN1 ₂	DAN1 ₂	DAN1 ₂	DAN1 ₂	DAN1 ₂	DAN1 ₂	DAN1 ₂
β 2-M, DOL1 ₂	Pearson Correlation	1	.396	.089	-.138	.572	.357	.528
	p		.104	.735	.396	.138	.020	.178
	N	42	18	17	40	8	42	8
α 1-M, DOL1 ₂	Pearson Correlation	.396	1	.265	-.082	-.194	-.171	.686
	p	.104		.322	.746	.713	.497	.089
	N	18	18	16	18	6	18	7
uKIM1, DOL1 ₂	Pearson Correlation	.089	.265	1	-.247	-.163	-.026	.090
	p	.735	.322		.340	.757	.922	.848
	N	17	16	17	17	6	17	7
sCysC, DOL1 ₂	Pearson Correlation	-.138	-.082	-.247	1	.171	.164	.139
	p	.396	.746	.340		.512	.101	.595
	N	40	18	17	106	17	101	17
uNGALaps, DOL1 ₂	Pearson Correlation	.572	-.194	-.163	.171	1	-.247	.166
	p	.138	.713	.757	.512		.340	.790
	N	8	6	6	17	17	17	5
sNGAL, DOL1 ₂	Pearson Correlation	.357	-.171	-.026	.164	-.247	1	.228
	p	.020	.497	.922	.101	.340		.378
	N	42	18	17	101	17	103	17
uNGAL, DOL1 ₂	Pearson Correlation	.528	.686	.090	.139	.166	.228	1
	p	.178	.089	.848	.595	.790	.378	
	N	8	7	7	17	5	17	17

U najranijoj tački merenja; drugi sat prvog dana (DAN1₂) β 2-mikroglobulin je bio u značajnoj korelaciji sa ostalim biomarkerima: α 1-M, r=0.396; uNGAL, r=0.528; uNGALaps, r=0.572; sNGAL r=0.357.

Tabela 38. Korelacije β 2-M sa ostalim biomarkerima u DAN1₄

BIOMARKER		β 2-M	α 1-M	uKIM1	sCysC	uNGAL _{aps}	sNGAL	uNGAL
		DAN1 ₄	DAN1 ₄	DAN1 ₄	DAN1 ₄	DAN1 ₄	DAN1 ₄	DAN1 ₄
β 2-M DAN1 ₄	Pearson Correlation	1	-.100	.028	-.002	.236	.184	.224
	p		.530	.862	.989	.132	.244	.154
	N	42	42	40	42	42	42	42
u α 1-M.DAN1 ₄	Pearson Correlation	-.100	1	-.002	-.058	.114	.085	.093
	p	.530		.988	.553	.268	.384	.361
	N	42	108	106	108	97	108	98
uKIM1 DAN1 ₄	Pearson Correlation	.028	-.002	1	.097	.234	.454	.208
	p	.862	.988		.325	.023	.000	.042
	N	40	106	106	106	95	106	96
sCysCDAN1 ₄	Pearson Correlation	-.033	-.140	.063	1.000	.078	.254	.093
	p	.835	.148	.518	.	.448	.008	.361
	N	42	108	106	108	97	108	98
uNGALapsDAN1 ₄	Pearson Correlation	.304	.081	.258 [*]	.078	1.000	.429 [*]	.981
	p	.051	.428	.012	.448	.	.000	.000
	N	42	97	95	97	97	97	97
sNGALDAN1 ₄	Pearson Correlation	.430 ^{**}	.046	.418 ^{**}	.254	.429	1.000 ^{**}	.427
	p	.004	.634	.000	.008	.000	1.000 ^{**}	.000
	N	42	108	106	108	97	108.	98
uNGAL ₇ DAN1 ₄	Pearson Correlation	.287	.070	.238 [*]	.093	.981	.427 [*]	1.000
	p	.065	.494	.019	.361	.000	.000	.000
	N	42	98	96	98	97	98	98

U prvom danu, četvrti sat merenja (DAN1₄) β 2-mikroglobulin je bio u značajnoj korelaciji sa ostalim biomarkerima; sNGAL, r=0.430; uNGALaps, r=0.304; uNGAL, r=0.287.

Tabela 39. Korelacije β 2-M sa ostalim biomarkerima u DAN1₆

BIOMARKER		β 2-M	α 1-M	uKIM1	sCysC	uNGAL _{aps}	sNGAL	uNGAL
		DAN1 ₆	DAN1 ₆	DAN1 ₆	DAN1 ₆	DAN1 ₆	DAN1 ₆	DAN1 ₆
β 2-M DAN1 ₆	Pearson Correlation	1	.447	-.047	-.029	.080	.024	.139
	p		.055	.745	.770	.535	.807	.280
	N	108	19	51	106	62	106	62
u α 1-M.DAN1 ₆	Pearson Correlation	.447	1	.136	-.143	-.426	-.452	-.254
	p	.055		.591	.559	.088	.052	.295
	N	19	19	18	19	17	19	19
uKIM1 DAN1 ₆	Pearson Correlation	-.047	.136	1	.098	.233	.367	.346
	p	.745	.591		.497	.128	.009	.020
	N	51	18	51	50	44	49	45
sCysCDAN1 ₄	Pearson Correlation	-.029	-.143	.098	1	.088	.132	.145
	p	.770	.559	.497		.501	.178	.268
	N	106	19	50	106	60	105	60
uNGALapsDAN1 ₆	Pearson Correlation	.080	-.426	.233	.088	1	.139	.396
	p	.535	.088	.128	.501		.288	.002
	N	62	17	44	60	62	60	56
sNGALDOL1 ₆	Pearson Correlation	.024	-.452	.367**	.132	.139	1	.484**
	p	.807	.052	.009	.178	.288		.000
	N	106	19	49	105	60	106	60
uNGAL,DAN1 ₆	Pearson Correlation	.139	-.254	.346*	.145	.396	.484	1*
	p	.280	.295	.020	.268	.002	.000	
	N	62	19	45	60	56	60	62

U prvom danu, šesti sat merenja (DAN1₆) β 2-mikroglobulin je bio u značajnoj korelaciji sa ostalim biomarkerima; sa α 1-M $r=0.447$, uNGAL $r=0.139$.

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). * . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tabela 40. Korelacije β 2-M sa ostalim biomarkerima u DAN3

BIOMARKER		β 2-M DAN3	α 1-M DAN3	uKIM1 DAN3	sCysC DAN3	uNGAL _{aps} DAN3	sNGAL DAN3	uNGAL DAN3
β 2-M DAN3	Pearson Correlation	1	.267**	.152	.043	.110	.028**	.104
	p		.005	.122	.661	.276	.776	.304
	N	108	108	105	108	100	107	100
u α 1-M.DAN3	Pearson Correlation	.267**	1	.095	-.138	.008**	-.084	.020
	p	.005		.336	.155	.939	.392	.844
	N	108	108	105	108	100	107	100
uKIM1 DAN3	Pearson Correlation	.152	.095	1	.304**	-.011	.267	-.004
	p	.122	.336		.002	.911	.006	.966
	N	105	105	105	105	99	105	99
sCysCDAN3	Pearson Correlation	.043	-.138	.304**	1	.170	.164	.183**
	p	.661	.155	.002		.091	.091	.069
	N	108	108	105	108	100	107	100
uNGALapsDAN3	Pearson Correlation	.110	.008	-.011	.170	1	.268	.985
	p	.276	.939	.911	.091		.007	.000
	N	100	100	99	100	100	100	100
sNGALDAN3	Pearson Correlation	.028	-.084	.267**	.164	.268	1	.242**
	p	.776	.392	.006	.091	.007		.015
	N	107	107	105	107	100	107	100
uNGAL,DAN3	Pearson Correlation	.104	.020	-.004	.183	.985	.242	1
	p	.304	.844	.966	.069	.000	.015	
	N	100	100	99	100	100	100	100

U trećem danu sat merenja (DAN3) β 2-mikroglobulin je bio u značajnoj korelaciji sa ostalim biomarkerima; sa α 1-M $r=0.267$, sNGAL $r=0.028$.

Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabela 41. Korelacije β 2-M sa ostalim biomarkerima u DAN7

BIOMARKER		β 2-M DAN7	α 1-M DAN7	uKIM1 DAN7	sCysC DAN7	uNGAL _a DAN7	sNGAL DAN7	uNGAL _s DAN7
β 2-M DAN7	Pearson Correlation	1	.296	.073	-.021	.026	.033	.007
	p		.106	.464	.829	.796	.732	.942
	N	107	31	102	107	105	107	105
u α 1-M.DAN7	Pearson Correlation	.296	1	-.166	.114	-.102	.143	-.074
	p	.106		.379	.541	.584	.441	.691
	N	31	31	30	31	31	31	31
uKIM1 DAN7	Pearson Correlation	.073	-.166	1	.271**	.073	.272	.075
	p	.464	.379		.006	.468	.006	.460
	N	102	30	102	102	100	102	100
sCysCDAN3	Pearson Correlation	-.021	.114	.271**	1	.278	.160	.286**
	p	.829	.541	.006		.004	.100	.003
	N	107	31	102	108	105	107	105
uNGALapsDOL7	Pearson Correlation	.026	-.102	.073	.278**	1	.134	.970
	p	.796	.584	.468	.004		.173	.000
	N	105	31	100	105	105	105	105
sNGALDAN7	Pearson Correlation	.033	.143	.272**	.160	.134	1	.148**
	p	.732	.441	.006	.100	.173		.133
	N	107	31	102	107	105	107	105
uNGAL,DAN7	Pearson Correlation	.007	-.074	.075	.286**	.970	.148	1
	p	.942	.691	.460	.003	.000	.133	
	N	105	31	100	105	105	105	105

U sedmom danu merenja (DAN7) β 2-mikroglobulin je bio u značajnoj korelaciji sa ostalim biomarkerima; sa α 1-M $r=0.296$, sNGAL $r=0.033$.

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). * . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

5. DISKUSIJA

Akutno oštećenje bubrega novorođenčeta, nastaje najčešće kao posledica perinatalne asfiksije, kompleksan je i čest problem neonatalnog perioda naročito novorođenčadi tretirane u jedinicama intenzivne nege (NICU). Učestalost AKI novorođenčeta u NICU je od 30-70 % [1,2]. U celoj pedijatrijskoj populaciji učestalost AKI je najčešća u periodu novorođenčeta [2]. Bubrezi novorođenčeta imaju nizak JGF, koji se održava delikatnim balansom između vazokonstriktornih i vazodilatatornih sila. Nizak JGF bubrega novorođenčadi ograničava postnatalnu renalnu funkcionalnu adaptaciju na endogene i egzogene stresove. Ovaj ograničeni odgovor je predispozicija novorođenčeta za razvoj AKI i izraženija je u preterminske novorođenčadi. S obzirom na ovu predispoziciju rana identifikacija AKI u novorođenčeta je neophodna za očuvanje bubrežne funkcije.

Patogeneza bolesti je složena i multifaktorijalna. Riziko faktori su: perinatalna asfiksija, neadekvatan unos vode i elektrolita u prvim neonatalnim satima i danima, rana neonatalna dehidracija i hipotenzija, hiperhidracija, nefrotoksičnost brojnih medikamenata, neonatalna sepsa. Faktori rizika su i nizak AS, zakasnela reanimacija, način i procenat kiseonika primenjenog u reanimaciji, transport od porodilišta do odeljenja intenzivne nege, hipotermija, hipertermija novorođenčeta, prematuritet i brojni drugi problemi neonatalnog perioda. Ređi uzrok AKI novorođenčeta su urođene anomalije bubrega i urotrakta i infekcije urinarnog trakta (UTI). Nesumnjiva je pozitivna korelacija između indeksa oksidativnog stresa i oštećenja bubrega. Još uvek je nedovoljno istraženo pitanje i ostaje naučna nepoznanica zašto perinatalna asfiksija rezultuje akutnim oštećenjem bubrega samo u neke novorođenčadi [3]? Zašto neka novorođenčad sa najtežim oblicima perinatalne asfiksije ne ispoljavaju akutno oštećenje bubrega a neka sa umerenom perinatalnom asfiksijom imaju teške oblike AKI? Pretpostavke su da individualne razlike u ćelijskoj reakciji mogu biti odgovorne za različite kliničke posledice, što ističe značaj genetske predispozicije novorođenčadi za ispoljavanje akutnog oštećenja bubrega. Teškoće u definisanju akutnog oštećenja bubrega novorođenčeta su i dalje velike. Definicija AKI novorođenčeta je problematična, jer se trenutne dijagnoze zasnivaju na dva osnovna parametra serumskom kreatininu i diurezi. Kao i kod odraslih oba su kasne posledice oštećenja a ne marker samog oštećenja. Neonatalna fiziologija dodatno

komplikuje tumačenje ovih bioloških markera [3,35]. Neke važne činjenice treba razmotriti u bilo kojoj neonatalnoj definiciji ili dijagnozi. Opšte uverenje je da novorođenčad imaju neoliguričnu AKI [26], ali to može biti zabluda u nedostatku znanja o normalnoj diurezi (UO) novorođenčeta. Ukupna telesna voda kod novorođenčadi je veća nego kod odraslih. Posebno je visok procenat vode u telu preterminske novorođenčadi i do 80% telesne mase [36].

AKI novorođenčeta se dugo smatrao reverzibilnim sindromom. Međutim u poslednjoj deceniji se stav promenio, nakon mnoštva podataka iz eksperimentalnih radova na animalnim modelima i humanoj populaciji, jasno je da AKI novorođenčeta jeste ozbiljno stanje koje može dovesti do dugoročnih posledica, trajnog oštećenja bubrega CKD, kao i do ozbiljnih oštećenja drugih organa [58-60]. U odraslih pacijenata koji su preživeli AKI episode [61] registruje se veći mortalitet. Deca nakon AKI epizoda su u značajno višem riziku od dugoročnih posledica kao što su neke bubrežne bolesti Henoch - Schönlein purpura ili hemolitičko uremijski sindrom [62]. U poslednje vreme se ozbiljnije proučava dugoročna prognoza AKI kod dece i novorođenčadi bez osnovne bubrežne bolesti. U jednoj studiji novorođenčadi od 126 ispitanika koji su praćeni do tri godine nakon episode AKI [5]. U ovoj grupi 10% je razvilo CKD, koji je bio u direktnoj korelaciji sa AKI. Sa AKI u fazi 3 je bilo 17% ispitanika. U ovoj grupi 30 pacijenata je imalo neonatalni AKI, a 5 pacijenata (16.6%) razvilo CKD, što pokazuje da je ova populacija u većem rizik za razvoj CKD. U jednoj studiji procenjene su dugoročne AKI posledice u populaciji novorođenčadi [19]. Studije evaluacije CKD nakon AKI episode posebno kod novorođenčadi nedostaju. AKI novorođenčeta je sindrom sa teškim ranim i kasnim posledicama [3]. Nedavni napredak u definisanju i klasifikaciji AKI poboljšaće epidemiološke i kliničke studije u pedijatrijskoj populaciji, uključujući novorođenče. Novi biomarkeri AKI su veoma važni za ranu dijagnozu i mogu imati istaknuti značaj kod novorođenčadi, kod kojih se diureza menja, povećava sa sazrevanjem tubula a sCr nije idealan biomarker zbog poznatih osobina kreatinina i specifičnosti neonatalnog perioda.

Preterminsko novorođenče ima jedinstveni rizik za razvoj AKI zbog: nezrelosti svih organa i organskih sistema, posebno bubrega, nekompletne nefrogeneze, ranog izlaganja nefrotoksičnim lekovima, komorbiditeta specifičnih za prematuritet, udruženih teških stanja kao

što je ductus arteriosus perzistens (PDA) i respiratorni distress sindrom (RDS), intrakranijalna hemoragija (HIC). Poznata je osetljivost pretermiskog novorođenčeta na neke medikamente kao što su aminoglikozidi, nesteroidni antiinflamatorni lekovi, tipa indometacina, koji je u širokoj upotrebi u terapiji zatvaranja DAP i profilaksi HIC. Najčešći uzrok AKI kod pretermiske novorođenčadi je perinatalna asfiksija. Dijagnoza AKI kod novorođenadi je teška i problematična. Dijagnoza se postavlja na osnovu vrednosti serumskog kreatinina, koji nije idealan, ali je još uvek i ako najstariji, jedini zvaničan biomarker AKI [3]. Nedavna istraživanja su dovela do razvoja prospektivnih studija biomarkera za ranu detekciju AKI. Broj radova kod novorođenčadi je ograničen. Među ispitivanim biomarkerima najviše obećava NGAL. Cilj prvobitnih radova koji su ispitivali NGAL kod novorođenčadi je bio da se otkriju neke karakteristike NGAL kao što su zavisnost od gestacijske zrelosti, porođajne telesne težine, postnatalne dobi i izloženosti medikamentima. Značajan deo naše studije odnosi se na ispitivanje značaja NGAL u dijagnozi neonatalnog AKI. Početne studije su pokazale da novorođenčad sa nižom gestacijom i porođajnom telesnom masom imaju više nivoe NGAL. U studiji Lavery-a i saradnika urinarni NGAL je meren u 20 pretermiske novorođenčadi. Rezultati studije su pokazali da su više vrednosti urinarnog NGAL imala novorođenčad sa manjom gestacijom ili novorođenčad sa malom telesnom masom za gestaciju. Studija zaključuje da klinička upotreba uNGAL kao biomarkera neonatalnog AKI zaslužuje dalje ispitivanje [57]. Rana detekcija AKI u pretermiske novorođenčadi kliničarima bi omogućila ranu terapiju, precizniji, modifikovan unos tečnosti, bolju kontrolu koncentracija kalijuma i parenteralnu ishranu, adaptaciju doza i frekvence nefrotoksičnih lekova i upotrebu diuretika u oliguričnih pacijenata.

Pre 2004 godine opšti termin akutna bubrežna insuficijencija (AKI) je korišćen za strm i neprekidan pad u jačini glomerulske filtracije (JGF) koji rezultuje retencijom azotnih materija ureje i kreatinina i neazotnih materija. U zavisnosti od težine i trajanja renalne disfunkcije njihova akumulacija je praćena metaboličkim poremećajima, kao što su metabolička acidoza i hiperkalijemija, promene u balansu telesnih tečnosti i efektima na mnoge druge organske sisteme [1].

AKIN kriterijum

Iako je dijagnostički kriterijum za AKI i sistem stadijuma baziran na na RIFLE kriterijumu [7], dodate su brojne bitne modifikacije.

- Prvo dodatak apsolutne promene u sCr od $\geq 0,3\text{mg/dL}$ ($\geq 26.52\mu\text{mol/L}$) je baziran na epidemiološkim podacima koji pokazuju 80% porast rizika za mortalitet povezan sa ovim malim promenama [3-5].

- Drugo: eGFR kriterijum i stadijumi "gubitak" i "krajnji stadijum" su bili izostavljeni

- Treće: uključenje vremenskog ograničenja na 48 sati bazirano je na podacima koji su pokazali da su lošiji ishodi bili povezani sa porastom kreatinina u prvih 48 sati [5,14].

Važno je da, AKIN dijagnostički kriterijum, uključuje obe vrednosti, apsolutnu i procentualnu promenu sCr, što omogućava prilagođavanje varijacija u odnosu na uzrast, pol i indeks telesne mase i redukuje potrebu za osnovnom vrednošću kreatinina (baseline creatinin). S druge strane oni zahtevaju bar dve vrednosti kreatinina tokom 48 sati.

- Četvrto: AKI pacijenti kojima je neophodna akutna dijaliza su automatski izmešteni u stadijum 3, bez obzira na težinu njihovog AKI

Dva dodatna upozorenja su predložena:

- *prvi je da bi dijagnostički kriterijum trebalo primeniti nakon što je optimizovan hidracioni status

- *drugi je da mora biti isključena opstrukcija urotrakta ako je oligurija korišćena kao jedini dijagnostički kriterijum

Da li su AKIN modifikacije RIFLE suštinski promenile klasifikaciju pacijenata sa AKI ili poboljšale njegovu sposobnost da predvidi mortalitet u hospitalizovanih pacijenata, na prvi pogled nije jasno [15]. Ipak i ako modifikacije izgledaju kao neznatne, one su veoma bitne na što ukazuju neki autori. Foanidis i saradnici su izračunali da su modifikacije unele potencijalno značajne promene u dijagnozi i klasifikaciji AKI [16]. U multicentričnom pojednostavljenom fiziološkom skoru (SAPs) tri baze podataka, koristeći oba parametra, sCr nivoe i 24 satnu diurezu u kritično bolesnih pacijenata, AKI je klasifikovan korištenjem AKIN i RIFLE kriterijuma [16]. Prema proračunima Bagshaw-a isti rezultati su prevedeni u apsolutnu 7% razliku u AKI dijagnozi između AKIN i RIFLE kriterijuma. U totalu 10.5% klasifikovanih

kao da imaju AKI po RIFLE kriterijumu, bili su propušteni po AKIN; nasuprot tome RIFLE kriterijum je propustio samo 3.5% klasifikovanih u AKI grupu po AKIN kriterijumu [17].

KDIGO - Kidney Diseases Improving Global Outcomes

U pogledu univerzalnog značaja AKI, odsustvo vodiča za kliničku praksu baziranih na dokazima za ovaj problem, nametnulo je potrebu za definisanjem praktičnog AKI vodiča, što je inspirisalo radnu KDIGO grupu autora. Tvorci KDIGO vodiča su shvatili da u polju AKI ima prostora za poboljšanje internacionalne saradnje u razvoju, širenju i implementaciji vodiča za kliničku praksu. Pošto su dve slične definicije bazirane na sCr i diurezi (RIFLE i AKIN) predložene i procenjene, članovi radne KDIGO grupe su zaključili da postoji potreba za jedinstvenom definicijom AKI za praksu, istraživanje i javno zdravlje. Radna KDIGO grupa je smatrala da je najvažnije definisati jedinstvene okolnosti i potrebe zemalja u razvoju, posebno u detekciji AKI u ranim i reverzibilnim stadijumima da bi se sprečila progresija u krajnju fazu renalne bolesti. KDIGO vodiči za kliničku praksu uključili su prerađenu definiciju AKI dok su zadržali AKIN kriterijum određivanja stadijuma (Tabela 4). U KDIGO definiciji, vremenski okvir za apsolutni porast sCr od 0.3 mg /dL(26.5 μ mol/L) je zadržan iz AKIN definicije (48 sati) dok je vremenski okvir za 50% porast u serum kreatininu sedam dana, kao što je originalno predloženo po RIFLE kriterijumu. KDIGO kriterijum samo koristi promene u sCr i diurezi a ne promene u GFR za stadijume, sa izuzetkom dece mlađe od 18 godina, za koju je akutno smanjenje u procenjenom GFR $<35\text{ml/min}/1.73\text{m}^2$ je uključeno u kriterijum za stadijum 3 AKI [19]. Kao i u RIFLE i u AKIN kriterijumima pacijenti bi trebali biti klasifikovani prema kriterijumu koji rezultira najtežim stadijumom oštećenja. KDIGO je napravio jednu jasniju i jednostavniju dodatnu promenu kriterijuma. Za pacijente koji po serum kreatininu dostižu stadijum 3 (sCr $>4.0\text{mg/dL}$; $353.6\ \mu\text{mol/L}$), pre nego da zahtevaju akutni porast od 0.5 mg/dL($44.2\ \mu\text{mol/L}$), tokom neodređenog vremenskog perioda. Umesto toga KDIGO zahteva da pacijent prvo postigne promene bazne vrednosti kreatinina, određene definicijom ili 0,3 mg/dL($26.52\ \mu\text{mol/L}$) tokom vremenskog perioda od 48 sati ili porast veći od ≥ 1.5 puta od osnovne vrednosti. Ova promena pojednostavljuje kriterijum i dovodi definiciju i kriterijum stadijuma do veće jednakosti. Na primer ako pacijent pokazuje porast serum kreatinina sCr $\geq 0.3\ \text{mg/dL}$ ($26.52\ \mu\text{mol/L}$) tokom 48 sati i apsolutni sCr poraste do nivoa $\geq 4.0\ \text{mg/dL}$ ($353.6\ \mu\text{mol/L}$) ovaj pacijent bi trebao biti klasifikovan u stadijum 3. Ne govori se da li će pacijent

koji razvija akutnu, na već postojeću hroničnu bubrežnu insuficijenciju, brže dospeti u AKI stadijum 3 nego pacijent sa AKI koji počinje iz normalne bubrežne funkcije.

U primenjivanju definicija i stadijuma AKI neke bitne dodatne primedbe bi trebalo da budu učinjene. Prvo svrha postavljanja vremenskog okvira za dijagnozu AKI je da pojasni značenje reči "akutna". Vremenski okvir za novorođenče je jasan, ali je nekada nejasno, teže definisati, osnovnu vrednost kreatinina (baseline), u najčešćim slučajevima AKI novorođenčeta uzrokovanim perinatalnom asfiksijom. Da li je to vrednost sCr u trećem danu života, najniža vrednost kreatinina u prvoj nedelji života i/ili nedelji u kojoj je bolest počela, ili ako je AKI kasnije počeo, ona vrednost koja je prethodila porastu sCr od 0.3 mg/dL (26.52 μ mol/L)? AKI je definisan u uslovima procesa koji rezultuje 50% porastom sCr tokom jedne nedelje ili 0.3 mg/dL (26.52 μ mol/L) tokom 48 sati. Značajno je da nema odredbe kada se taj vremenski period od jedne nedelje i 48 sati može javiti, to ne mora biti prvih nedelju dana ili prvih 48 sati života, hospitalizacije ili boravka u jedinici intenzivne nege. Nije određeno da li se taj vremenski "prozor" odnosi na trajanje izazivajućeg događaja. Na primer pacijent može imati dvonedeljni tok sepse ili razviti AKI tek u drugoj nedelji. Bitno je da je prvo nedeljni ili 48-časovni vremenski okvir za dijagnozu AKI, ne za stadijume. Preporuka AKIN da bi kriterijum trebalo koristiti prateći adekvatnu nadoknadu tečnosti, kada je to primenjivo, je uklonjena iz KDIGO definicije.

I ako su svi ovi konsenzus kriterijumi (RIFLE, pRIFLE, AKIN i KDIGO) pomogli da se dijagnostikovanje i stadijumi AKI standardizuju, ipak ostaju specifična ograničenja. Jedno od najčešće diskutovanih ograničenja je značaj određivanja osnovne bubrežne funkcije u pacijenata svrstanih u AKI u kojih ova osnovna vrednost nije poznata. Nedostatak uniformnog pristupa za procenu osnovne vrednosti se nedavno pokazao da povećava rizik za pogrešnu klasifikaciju AKI, ometajući efektivna poređenja za ovu bolest među različitim okolnostima [20-22]. Kod novorođenčeta ovaj problem je posebno veliki, u odnosu na fiziologiju i/ili patofiziologiju u prvim danima života novorođenčadi, mi smo kao bazalnu vrednost u našem radu koristili vrednost sCr u trećem danu života. Nekoliko strategija za procenjivanje bazalnog sCr je bilo predloženo [22-25], rangirajući od upotrebe proračunavanja unazad za procenu sCr iz pretpostavljenog "standardnog JGF" od 75ml/min/1.73m², upotreba serumskog kreatinina na prijemu ili najviši serumski kreatinin u AKI epizodi koji pratimo. Dok RIFLE i KDIGO

preporučuju upotrebu serumskog kreatinina u nazad, AKIN preporučuje upotrebu "u napred" to jest evoluciju sCr u odnosu na prvu posmatranu vrednost u toj epizodi, dok European Renal Best Practice position statement and others [26] preporučuju serumski kreatinin na prijemu [27].

Osnovne kliničke karakteristike ispitivane novorođenčadi

Od kliničkih karakteristika ispitivane novorođenčadi prikazani su; pol, koji je bio dominantno muški. U osnovnom uzorku ispitanika bilo je 61.1% dečaka. Gestacijska zrelost: prosečna gestacijska zrelost svih ispitanika je bila (33.9 ± 2.0) gestacijskih nedelja, u grupi ispitanika koji su razvili AKI gestacija je bila (33.6 ± 2.0) , što je nešto niža gestacija, ali ne statistički značajno, u odnosu na grupu bez AKI gde je iznosila (34.4 ± 1.7) gestacijskih nedelja. Porodajna telesna masa: U odnosu na porodajnu telesnu masu ispitanici su bili dosta homogeni, prosečno (2214 ± 551) grama i među podgrupama nije postojala statistički značajna razlika u odnosu na ovaj parametar. Takođe, statistički značajne razlike nije bilo u odnosu na aktuelnu telesnu masu ispitanika koja je svakodnevno merena. Apgar Skor: U odnosu na vrednost AS ispitanici su se statistički značajno razlikovali u ne-AKI i AKI grupi ($p=0.046$). Deficit baze: Između AKI i ne-AKI grupe postojala je statistički značajna razlika u odnosu na ovaj parametar ($p=0.027$).

Vrednosti konvencionalnih biomarkera bubrežnog oštećenja kreatinina i diureze

Osnovna podela ispitanika učinjena je na AKI i ne-AKI grupu u odnosu na pojavu ili odsustvo bolesti, a sama AKI grupa dalje je podeljena prema AKIN klasifikaciji na AKIN1 (86.3%) i AKIN2 (16.4%). U našem uzorku nisu registrovana deca koja su razvila AKIN3 najteži oblik akutnog bubrežnog oštećenja. Svim ispitanicima u svim vremenskim tačkama je izračunat eCCL. Tabela 7.

Kreatinin kao osnovni "stari" biomarker, koji je bio i dijagnostiki kriterijum za AKI, imao je statistički značajno različite vrednosti u svim grupama i podgrupama ispitanika i u svim tačkama merenja. Bazalna vrednost kreatinina AKI vs ne-AKI ($p=0.001$); AKIN1 vs AKIN2 ($p=0.001$). Vrednost kreatinina u trećem danu ispitivanja (DAN3), AKI vs ne-AKI ($p=0.001$); AKIN1 vs AKIN2 ($p<0.001$). U sedmom danu ispitivanja (DAN7), vrednost kreatinina je bila statistički visoko značajna između AKI vs ne-AKI ($p<0.001$); AKIN1 vs AKIN2 ($p<0.001$).

Analogno tome statistički visoko značajne razlike prisutne su i u odnosu na procenjenu vrednost klirensa kreatinina eCCl, izračunat u svim grupama i podgrupama i u svim vremenskim tačkama ispitivanja. Diureza: nije bila statistički značajno različita u AKI i ne-AKI grupi ($p=0.32$), većina ispitanika u svim grupama i podgrupama je bila neoligurična. Statističke visoko značajne razlike između dve osnovne grupe ispitanika registrovane su u odnosu na pojavu hipoksijsko ishemijske encefalopatije (HIE) ($p<0.001$), primenu mehaničke ventilacije MV ($p<0.01$) i dužinu hospitalizacije u OIN ($p<0.01$). Tabela7.

Procenjivanje bazalnog serumskog kreatinina:

Ne postoji standardna definicija za bazalni serumski kreatinin sCr, što je dovelo do heterogenosti u različitim istraživačkim studijama [36] i mogućnosti za pogrešnu interpretaciju prave prirode poremećene bubrežne funkcije u hospitalizovanih pacijenata [21]. Bazalna vrednost serumskog kreatinina sCr je bila procenjena na različite načine, kao što je nivo na prijemu u bolnicu [16, 37], minimalni serumski nivoi kreatinina (najniža tačka, najniža vrednost) tokom hospitalizacije [37,38], unazad procenjena vrednost MDRD jednačine [6,15] ili najniža vrednost među ovima. Izbor tehnike za procenu koja je korišćena da bi se dobile vrednosti bazalnog serumskog kreatinina sCr ima efekta na prevalencu AKI, težinu ili stadijum bolesti i na rizik od mortaliteta povezan sa različitim stadijumima AKI [36,39].

U našem radu osnovna podela ispitanika učinjena je na AKI i ne-AKI grupu u odnosu na pojavu ili odsustvo bolesti, a sama AKI grupa dalje je podeljena prema AKIN klasifikaciji na AKIN1 (86.3%) i AKIN2 (16.4%). U našem uzorku nisu registrovana deca koja su razvila AKIN3 najteži oblik akutnog oštećenja bubrega. Svim ispitanicima u svim vremenskim tačkama je izračunat eCCl. Tabela7.

Kreatinin kao osnovni "stari" biomarker, koji je bio i dijagnostiki kriterijum za AKI, imao je statistički značajno različite vrednosti u svim grupama i podgrupama ispitanika i u svim tačkama merenja. Bazalna vrednost kreatinina AKI vs ne-AKI ($p=0.001$); AKIN1 vs AKIN2 ($p=0.001$). Vrednost kreatinina u trećem danu ispitivanja (DAN3), AKI vs ne-AKI ($p=0.001$); AKIN1 vs AKIN2 ($p<0.001$). U sedmom danu ispitivanja (DAN7), vrednost kreatinina je bila statistički visoko značajna između AKI vs ne-AKI ($p<0.001$); AKIN1 vs AKIN2 ($p<0.001$). Analogno tome statistički visoko značajne razlike prisutne su i u odnosu na procenjenu vrednost klirensa kreatinina eCCl, izračunat u svim grupama i podgrupama i u svim

vremenskim tačkama ispitivanja. Diureza: nije bila statistički značajno različita u AKI i ne-AKI grupi ($p=0.32$), većina ispitanika u svim grupama i podgrupama je bila neoligurična. Statističke visoko značajne razlike između dve osnovne grupe ispitanika registrovane su u odnosu na pojavu hipoksijsko ishemijske encefalopatije (HIE) ($p<0.001$), primenu mehaničke ventilacije MV ($p<0.01$) i dužinu hospitalizacije u OIN ($p<0.01$). Tabela 7.

Diureza:

Diureza je kao značajan pokazatelj bubrežne funkcije uključena u sve klasifikacione sisteme AKI. Urin je lako dostupan, može se često uzorkovati, ne zahteva hospitalizaciju, može se uzeti od svih osim anuričnih pacijenata. Koristan je u predikciji, početnoj dijagnozi bolesti, praćenju i vođenju lečenja, u napredovanju, zaustavljanju i oporavku bubrežne funkcije [165]. RIFLE; pRIFLE, AKIN i KDIGO koriste iste kriterijume diureze da definišu AKI i odrede njegovu težinu. Pošto tačni podaci o diurezi nisu uvek dostupni, manji broj retrospektivnih studija je uključio diurezu, kao kriterijum. Teoretski merenje diureze tokom šest ili dvanaest sati je predloženo po RIFLE, pRIFLE, AKIN ili KDIGO. Kontinuirano praćenje diureze je praktično ograničeno na kritično bolesne pacijente primljene u jedinicama intenzivne nege. Ipak nalaz akutne oligurije čak grubo izmerene u 24 satnom sakupljanju urina može biti značajan i rani dijagnostički pokazatelj bubrežne disfunkcije. Pošto se mnogi slučajevi AKI javljaju u hospitalizovanih pacijenata, mogli bi se pacijentima preporučiti da sakupljaju urin tokom intervala od osam sati paralelno sa normalnim smenama medicinskog osoblja. Kada je definisana u ovim 6-8 časovnim blokovima diureza je nazavisno povezana sa mortalitetom, morbiditetom, i renalnim ishodom [41,42]. Značaj diureze prikazan je u studiji Wlodzimirov i saradnici [43]. Oni su napravili prospektivnu studiju RIFLE klasifikacije sa sCr i diurezom (OU) (RIFLE sCr+OU) i bez diureze (RIFLE sCr) za AKI u 260 kritično bolesnih pacijenata. RIFLE sCr je značajno potencirao prisustvo AKI na prijemu i tokom prve nedelje u ICU i značajno odložio dijagnozu AKI. Druga skorašnja studija je korišćenjem velike kohorte neselektovanih kritično bolesnih pacijenata, ispitala empirijske povezanosti između: sCr, diureze, opservacionog perioda, hospitalnog mortaliteta i terapije zamene bubrega (RRT) [44]. Da bi vizualizovali zavisnost od prilagođenog mortaliteta i RRT stepena na sCr, diurezu i opservacioni period, nacrti su osmišljeni da obezbede kompletnije slike AKI što se tiče rizika za hospitalni mortalitet i predviđanja potrebe za RRT. Uopšteno težina AKI je bila visoka kada je:

1. Apsolutni porast sCr je bio visok i opservacioni period dug
2. Procenat sCr porasta bio je visok i opservacioni period dug
3. Oligurija se održavala tokom dugog vremenskog perioda

Sličini šabloni su se javili za intrahospitalni mortalitet i RRT stepenove. Takođe ova studija oslikava značaj trajanja oligurije kao jednog od parametara za određivanje ishoda kritično bolesnih pacijenata sa AKI.

U našoj studiji dijagnoza AKI je postavljena na osnovu vrednosti serumskog kreatinina, prema AKIN kriterijumu, po kome se AKI definiše kao naglo smanjenje bubrežne funkcije u toku 48 sati, mereno apsolutnim povećanjem koncentracije kreatinina u serumu za 0.3 mg/dL (26.52 μ mol/L) u odnosu na bazalnu vrednost (AKIN sCr). Kao bazalnu vrednost uzeli smo vrednost kreatinina u trećem danu života. Oliguriju smo registrovali, pratili, koristili u proceni kliničkog stanja pacijenta, takođe statistički analizirali, ali je nismo smatrali dijagnostičnim kriterijumom. U našoj studiji urin kolekcije su ostvarivane tokom 24 sata, u plastične vrećice ili ako je bilo potrebno učinjena je kateterizacija mokraćne bešike. U prvih sedam dana kontinuirano, sa maksimalnom pažnjom i preciznošću izbegavajući gubitak jedne jedine kapi urina, vršeno je merenje diureze. Na ovaj način grubom i orijentacionom kolekcijom nismo uvek uspeali obezbediti željene uzorke, tako da postoje vremenski intervali u kojima nismo "uhvatili" i zabeležili ni jednu vrednost urina. Čak i kada su kolekcije bile optimalne neki termini su ostali bez uzorka urina jednostavno zbog odložene prve ili neke od početnih mikcija. Zbog toga nismo kriterijum diureza izabrali kao dijagnostični. Merenja biomarkera urađena su kao slepe probe.

U sistemu AKIN klasifikacije kategorije 1, 2, 3 zamenjuju tri stepena jačine R, I, F iz RIFLE klasifikacionog sistema. Tabela 1. [16]. (AKIN1): stepen 1 uključuje pacijente sa porastom sCr 1.5-1.9 puta od osnovne vrednosti ili porast sCr \geq 26.52 μ mol/L, (AKIN2): stepen 2 uključuje pacijente sa porastom sCr 2.0-2.9 puta od osnovne linije i konačno (AKIN3): stepen 3 uključuje pacijente sa sCr 3.0 puta u odnosu na bazalnu vrednost. Naša grupa ispitanika je imala umerenu perinatalnu asfiksiju i najveći broj je razvio umereniji oblik AKI. U ovom ispitivanju su dominirali ispitanici sa AKIN1 (83.60%) u odnosu na značajno manji broj ispitanika sa AKIN2 (16.40%), nije registrovano ni jedno novorođenče sa AKIN3 oblikom bolesti. Tabela 2. Svoj novorođenčadi je prema modifikovanoj Švarcovojoj formuli procenjena

vrednost kreatinina (eCCI) sa faktorom $k=29.2$ za novorođenče. Tabela 7. Fokus našeg ispitivanja je umerena perinatalna asfiksija i pokušaj da se u ovoj grupi novorođenčadi utvrdi stanje i incidenca AKI, vrsta, ne-oligurijski ili oligurijski, težina i ostale karakteristike bolesti. Upravo ova grupa je grupa najvećeg rizika, jer je u njoj AKI često neočekivan, nemanifestan ili neoliguričan. Kao takav može biti neprepoznat sve dok ozbiljno ne ugrozi novorođenče. U situacijama normalne diureze AKI može biti nedijagnostikovano ako serumski kreatinin nije izmeren. Tip i stepen renalnog oštećenja generalno diktiraju da li novorođenče ima oligurijski ili neoligurijski AKI. Kao i kod veće dece i odraslih i kod novorođenčeta AKI može biti oligurijsko-anurijski (definisan kao diureza manja od 1ml/kg/h ili 0,5ml/kg/h, ili nedostatak diureze tokom 48h) i neoligurijski.

Oligurija se smatra dodatnim ili alternativnim marker AKI. Postojeće definicije AKI predložili su sledeći sistemi RIFLE [43, 32], [44], pRIFLE [45,33] AKIN [34] i KDIGO [21,22] koje koriste iste urin izlazne kriterijume za definisanje AKI i potvrde svoju ozbiljnost. Oni su svakako korisni i već široko potvrđeni [47]. Međutim s obzirom na velike razlike u neonatalnoj populaciji, pre svega u različitim gestacijskim klasama prevremeno rođene dece (nezreo tubulski sistem, veća ukupna telesna voda, specifična prateća stanja RDS, DAP, HIC, BPD), teško je prihvatiti ove, urin izlazne kriterijume za novorođenče, posebno preterminsko [48]. Pokazano je da je diureza manja od 0,5 ml/kg/h neosetljiv marker AKI [49]. Dokazano je da je diureza manja od 1.5 ml/kg/h povezana sa većim mortalitetom, dužinom mehaničke ventilacije i trajanjem hospitalizacije [49]. Da bi prevazišli problem u dijagnozi AKI u odnosu na diurezu novorođenčeta, mi nismo uključili diurezu u kriterijume za dijagnozu AKI u preterminske novorođenčadi. Kod novorođenčadi, neoligurična bubrežna insuficijencija može biti prisutna u više od 50% slučajeva [41,42]. U našoj studiji diureza je bila sistematski merena, merenjem pelena, prikupljanjem u kesice ili putem urinarnog katetera. Niko od naših pacijenata nije primio diuretike u prvih 48 sati, zato su naši rezultati pravi odraz njihove bubrežne funkcije. Samo 9 (8.3%) bolesnika su bili oligurični, 4 novorođenčadi u ne-AKI i 5 novorođenčadi u AKI grupi, tako da u pogledu diureze između ne-AKI vs AKI nije bilo statistički značajne razlike; ($p=0.061$). Ovo zapažanje ukazuje da diureza ne može biti pouzdan marker AKI u preterminske novorođenčadi nakon umerene PNA. Većina naših pacijenata (83.6%) nisu bili oligurični, i ako nisu dobili diuretike u prvih 48 sati. Takođe nije bilo statistički značajne razlike u diurezi između ne-AKI i AKI pacijenata, $p=0.061$. Mi smo diurezu precizno merili, u tom delu

merjenja imali najviše angažmana i problema, ali je nismo smatrali markerom AKI, niti smo je koristili kao dijagnostički faktor. Naša podjela i klasifikacija AKI je izvršena prema AKIN kriterijumu, samo u odnosu na sCr nivoe (AKIN sCr).

U zaključku ovog dela diskusije ističemo da su postojeći kriterijumi predloženi od RIFLE, pRIFLE, AKIN i KDIGO veoma korisni i već široko provereni. Postojeće definicije AKI su daleko od savršenih u tome što se oslanjaju na nesavršene markere bubrežne funkcije pre nego na direktne mere bubrežnog oštećenja. Ipak postoji nada da će se u budućnosti ovo prevazići [28]. Novi biomarkeri koji direktno procenjuju oštećenja bubrega su pod intenzivnim istraživanjem [48]. Ipak bubrežna funkcija će ostati validan i značajan parametar i verovatnije je da će sledeća generacija AKI kriterijuma pored funkcionalnih parametara, takođe uključiti jedan ili više biomarkera oštećenja [49].

Novi biomarkeri AKI novorođenčeta

U poslednjoj deceniji su učinjeni veliki napori da se nešto više sazna o pouzdanosti ranih biomarkera AKI. Pojavili su se mnogi kandidati za nove AKI biomarkere, uključujući: NGAL, Cys-C, KIM-1, L-FABP, IL-6, IL-18, HGF, VEGF, β_2 -M, α_2 -M, OPN i FGF-23, koji su nedavno testirani [9-20][22,23]. Među ispitivanim biomarkerima najviše obećava NGAL, koga možemo određivati u urinu i serumu, kao serumski sNGAL i urinarni uNGAL [21]. Dosadašnje studije su pokazale da su nivoi NGAL u plazmi i urinu bili u pozitivnoj korelaciji sa nivoima serum kreatinina. Cilj prvobitnih radova kod novorođenčadi je bio da se otkriju neke karakteristike NGAL kao što su: zavisnost od gestacijske zrelosti, porođajne telesne težine, postnatalne dobi i izloženosti medikamentima. Početne studije su pokazale da novorođenčad sa nižom gestacijom i porođajnom telesnom masom imaju više nivoe NGAL. Broj studija o NGAL, urinarnom i serumskom, je veoma mali i one su izvedene na ograničenom broju prevremeno rođene dece sa APN [22-36]. Od 2003 godine Mishra i saradnici su ukazali na značaj uNGAL kod pacijenata posle kardiohirurgije [22, 23], broj radova se vremenom rapidno povećava i potvrđuje ulogu uNGAL u predviđanju AKI [9,24,28]. Prema našim saznanjima samo je nekoliko autora pokazalo značaj uNGAL u preterminske novorođenčadi [34,35]. Početne studije ističu značaj uNGAL kao ranog AKI biomarkera, u odraslih i dece, u definisanim situacijama nakon kardiopulmonalanog baj-pasa, nakon CIN, kod kritično bolesnih u ICU ili nakon traumatizma. Podvlačimo najznačajnije uloge NGAL: povećava enzimsku aktivnost

MMP-9, vezujući se za MMP-9, on je apoptotični faktor preživljavanja, faktor rasta i diferencijacije bubrega, potstiče epitelizaciju i diferencijaciju, kontroliše ćelijski opstanak i diferencijaciju, ima zaštitnu ulogu u očuvanju funkcije bubrega, učestvuje u transportu gvožđa, preko siderofora, NGAL je indukovan tumor promovišućim agensima, značajan faktor odbrane u bakterijskim infekcijama, jer je važna komponenta urođenog imunskog sistema. Zbog velikog značaja ovog biomarkera, prvenstveno smo određivali njegove vrednosti u serumu i urinu preterminske novorođenčadi.

Serum NGAL (sNGAL)

Značaj sNGAL kod novorođenčeta je veliki jer je on lako dostupan biomarker AKI, čak i kod anuričnih pacijenata. Serum je stabilniji od urina i manje sklon bakterijskoj kontaminaciji, siguran i uvek dostupan biološki materijal, čist izvor biomarkera, oslobođen efekata komorbiditeta, koji nisu svojstveni novorođenčetu. Serumski NGAL je moguće odrediti rano po rođenju u prvim satima života i prema tim vrednostima napraviti procenu bubrežnog oštećenja. Protokol ove studije je predvideo uzimanje uzoraka seruma i urina u istim vremenskim tačkama i istovremeno merenje oba biomarkera, sNGAL i uNGAL, kao i merenje konvencionalnih markera AKI, serumskog kreatinina i diureze. To nije uvek bilo moguće ostvariti u celini u istim i svim vremenskim tačkama. Uzorci urina su uzimani ukoliko su bili dostupni. Neki razlozi za nedostatak uzoraka urina su bili odlaganje mokrenja ili oligurija. Zato je najsvеobuhvatniji i najprecizniji deo ove studije onaj koji se odnosi na serumski NGAL. Serumski NGAL (sNGAL) je meren u serumu ispitanika u protokolom studije određenim tačkama ispitivanja i realizacija tog plana je bila gotovo 100%. Prednost ovoga dela ispitivanja je maksimalna preciznost u uzimanju uzoraka i ostvaren najveći broj prikupljenih uzoraka krvi za sNGAL što daje veliku snagu studiji. Serumski NGAL je određen u svih pet protokolom studije definisanih tačaka merenja. U najranijim tačkama merenja u [DAN₁₂; n=103(95.37%)] je omogućio najraniji uvid u stanje bubrežne funkcije, samo dva sata po prijemu u NICU, što je za neku novorođenčad, koja su transportovana u naš NICU neposredno po rođenju bio istovremeno drugi sat života. Takođe u [DAN₁₄; n=108(100%)] svim ispitanicima su izmerene vrednosti sNGAL, dalje u [DAN₁₆; n=106(98.14%)], u [DAN₃; n=107(99.07%)] i [DAN₇; n=107(99.07%)]. Početne vrednosti sNGAL među grupama su se razlikovale. Vrednosti sNGAL su se razlikovale i u ispitivanim podgrupama, menjale kroz vreme i ta je promena među

njima bila statistički veoma značajna. ($F=7.059$, $P=0.000$). Tabele 8_a i 8_b. Merene vrednosti su izražene u ng/mL (metrički sistem) Tabela 8a, a potom izračunate i vrednosti u mmol/L (SI sistem), Tabela 8b.

Od početnih tačaka merenja vrednosti sNGAL su rasle kroz vreme i ovaj porast direktno je proporcionalan sa bubrežnim oštećenjem. Vrednosti biomarkera rastu do određene tačke u kojoj dostižu maksimum a sa početkom oporavka počinju da padaju. Vrednosti biomarkera i bubrežna povreda kreću se u istim pravcima. Vrednosti biomarkera i bubrežni oporavak kreću se u suprotnim pravcima.

Analizirali smo pojedinačno vreme za ispitivani biomarker (sNGAL) i razlike u odnosu na AKI i AKIN. Prirodan zahtev je bio, analizirati dinamiku promene pojedinačnog biomarkera i ispitati, što je možda još važnije, da li je ta promena ista ili značajno različita u različitim AKI kategorijama. Odgovore na ova pitanja daje ANOVA (Fišerova jednofaktorska ANOVA za ponovljena merenja; horizontalna analiza, koja analizira promenu vrednosti sNGAL u vremenu i značajnost te promene u različitim AKI kategorijama. ANOVA pokazuje da se vrednosti sNGAL značajno menjaju kroz vreme u svih ispitanika i različito u različitim grupama: AKI/ ne-AKI grupi, AKIN1/i AKIN2 i ne-AKI/ AKIN1/ AKIN2. Tabela 8a, 8b i Figura 2 (a,b,c,d).

•Analiza vrednosti sNGAL u svih pet tačaka merenja

b) ne-AKI i AKI, dve osnovne grupe ispitanika, prikazuje promenu vrednosti sNGAL izmerene u svih pet tačaka merenja u sve ispitivane novorođenčadi. Regstruje se rani porast vrednosti sNGAL u prvom danu ispitivanja sa statistički značajnom razlikom između grupa u najvećem broju pojedinačnih tačaka merenja u $DAN1_2$ $p=0.000$; $DAN1_4$ $p=0.000$ i $DAN1_6$ $p=0.003$. U narednim tačkama merenja $DAN3$ $p=0.059$, $DAN7$ $p=0.147$ ta razlika gubi statističku značajnost. Analiza celokupnog vremena ispitivanja pokazuje da je razlika između ove dve grupe tokom celog ispitivanja u svim tačkama merenja statistički veoma značajna: ($F=8.682$, $p=0.004$); Figura 3(a).

b) AKIN1 i AKIN2, dve podgrupe AKI grupe, prikazuje promenu vrednosti sNGAL u ispitanika u ovim podgrupama AKIN1 i AKIN2 u svih pet tačaka merenja. Vrednosti sNGAL rano rastu u prvom danu ispitivanja, značajno više u AKIN2 nego AKIN1. Porast je najveći u

DAN₁₄ p=0.026. Tokom vremena u narednim tačkama merenja razlika između podgrupa nije statistički značajna: (F=3.412, p=0.069); Figura 3(b)

c) ne-AKI, AKIN1 i AKIN2, svi ispitanici, prikazuje promenu sNGAL u svih pet tačaka merenja u svih ispitanika posmatranih kroz ovu grupu i podgrupe. Razlike u vrednostima sNGAL statistički su značajne u

DOL₁₂ [p=0.001(ne-AKIvsAKIN1); p=0.002 (ne-AKIvsAKIN2)]

DOL₁₂ [p=0.001(ne-AKIvsAKIN1); p=0.002 (ne-AKIvsAKIN2)]

DOL₁₄ [p=0.003(ne-AKIvsAKIN1); p=0.000 (ne-AKIvsAKIN2)]

DOL₁₆ [p=0.27 (ne-AKIvsAKIN1); p=0.009 (ne-AKIvsAKIN2)]

(Multipla komparacija)

Posmatrane kroz vreme sve grupe imaju statistički veoma značajnu promenu sNGAL:

(F= 5.963, p= 0.004); Figura 3(c).

d) Svi ispitanici posmatrani kao jedinstvena celina u svim tačkama merenja. Serum NGAL koncentracije značajno su se menjale tokom celog opservacionog perioda. Prisutne su promene vrednosti sNGAL u sve ispitivane novorođenčadi u pet tačaka merenja, ANOVA koja testira multivarijacioni efekat vremena na promene

•Analiza vrednosti sNGAL u četiri tačke merenja

Pokazane su vrednosti sNGAL u izdvojene četiri tačke merenja (u prvom danu: četvrtog i šestoga sata: DAN₁₄ i DAN₁₆; u trećem danu, DAN₃ i sedmom danu, DAN₇) tim redom po grupama: ne-AKI/AKIN1/AKIN2. Horizontalna analiza: Figura 4.

a) ne-AKI i AKI dve osnovne grupe ispitanika, prikazuje promenu vrednosti sNGAL izmerene u četiri tačke merenja dve u prvom danu, četvrti i šesti sat i po jedna u trećem i sedmom danu merenja: DAN₁₄, DAN₁₆, DAN₃, DAN₇, tim redom u sve ispitivane novorođenčadi. Regstruje se porast vrednosti sNGAL u prvom danu ispitivanja sa statistički značajnom razlikom u izdvojenim pojedinačnih tačkama merenja u DAN₁₄ p=0.000 i DAN₁₆ p=0.003. U narednim tačkama merenja DAN₃ p=0.059, DAN₇ p= 0.147, razlika gubi statističku značajnost. Figura 4(a)

b) AKIN1 i AKIN2 dve podgrupe AKI grupe, prikazuje promenu vrednosti sNGAL u ispitanika u ovim podgrupama AKIN1 i AKIN2 u četiri tačke merenja. Vrednosti sNGAL rano rastu u prvom danu ispitivanja, značajno više u AKIN2 nego AKIN1. Taj porast je najveći u DAN1₄ p=0.000; tokom vremena u narednim tačkama merenja ta razlika i dalje postoji ali je nešto manja. (F= 3.672, p=0.021); Figura 4(b)

c) ne-AKI, AKIN1 i AKIN2, svi ispitanici, prikazuje promenu sNGAL u četiri tačke merenja u svih ispitanika posmatranih kroz ovu grupu i podgrupe. Razlike u vrednostima sNGAL statistički su značajne u:

DAN1₄ [p=0.003 (ne-AKIvsAKIN1); p=0.000 (ne-AKIvsAKIN2)]

DAN1₆ [p=0.270(ne-AKIvsAKIN1);p=0.009(ne-AKIvsAKIN2)];(Multipla komparacija)

Posmatrane kroz vreme sve grupe imaju statistički veoma značajnu promenu sNGAL:

(F=4.372, p=0.001); Figura 4(c)

Prediktivna sposobnost sNGAL kod preterminske novorođenčadi izražena je izračunatim veličinama AUC-ROC sa CI 95% i značajnošću p=0.05. Ova vrednost je u AKI grupi bila zadovoljavajuća u drugom i četvrtom satu prvog dana ispitivanja. Iznosila je za: DAN1₂ ROC= 0.72, sa senzitivnošću 69.00% i specifičnošću 71.90%; DAN1₄ ROC=0.72, sa senzitivnošću 65.75% i specifičnošću 74.29%. Veoma dobar AUC-ROC je registrovan u AKIN1 takođe u prvom danu DAN1₄ ROC=0.72 sa senzitivnošću 91.67% i specifičnošću 54.10%; Tabela 3. Figura 1.

Značajno poboljšanje prediktivne sposobnosti sNGAL AUC-ROC ostvareno je prilagođavanjem, ađastiranjem sNGAL na pridružene varijable: pol, gestaciju, porođajnu telesnu masu i bazni deficit. Nakon ađastiranja prediktivna sposobnost sNGAL statistički se značajno poboljšala. Najveći AUC-ROC imao je ađastirani sNGAL u drugom satu prvog dana ispitivanja i iznosio je: AUC-ROC = 0.80[95%(0.70-0.89)] p<0.000: u DAN1₂ u AKI grupi. Ovo je po klasifikaciji De Longa vrlo dobra vrednost. Figura 2. Ishod ađastiranja potvrđuje da vrednosti sNGAL kod preterminskog novorođenčeta zavise od: gestacije, telesne mase, pola, metaboličkog i acido-baznog statusa. Ovo su za preterminsko novorođenče sa perinatalnom asfiksijom najvažnije karakteristike koje su u tesnoj vezi sa bubrežnom funkcijom. Gestacijska

zrelost određuje i direktno je proporcionalna sa zrelošću i funkcijom bubrega, telesna masa je uobičajeno u pozitivnoj korelaciji sa gestacijom, a metabolički i acido-bazni status u velikoj meri, direktno i indirektno zavise od bubrežne funkcije. Zbog toga je prilagođavanje učinjeno baš na ove varijable, koje su u kompleksnom međusobnom i značajnom direktnom odnosu sa bubrežnom funkcijom. Izvori sNGAL koji prate AKI novorođenčeta zahtevaju dalje razjašnjavanje i studije tog problema.

Mnogi autori su istraživali značaj serumskog NGAL u dijagnozi AKI u novorođenčadi (Table 15). Krawczeski (Table 15) i saradnici su ispitivali i serum i urinarni NGAL u 374 dece nakon kardioplulmonalnog by-passa (CBP) [7]. Samo 35 su bila novorođenčad i 5(14.3%) su razvili AKI. Oni su pronašli da je NGAL predvideo AKI u drugom satu nakon CBP sa AUC u rangju od 0.74-0.88. [7]. U studiji Sarafidisa i saradnika koja je uključila 13 asfiktčne novorođenčadi i 22 ne asfiktčne novorođenčadi osmoro je imalo AKI [9]. Serumski NGAL i urin NGAL kao i serumski cystatin C bolje predviđaju PNA nego AKI, takođe su njihove vrednosti bile veće u asfiktčne novorođenčadi čak i u onih koji nisu razvili AKI [9]. Ragall i saradnici su ispitivali sNGAL u 30 novorođenčadi sa HIE od kojih je 13(43.3%) razvilo AKI [21]. Oni su pronašli porast sNGAL merenog tokom šest sati posle rođenja na što pouzdano ukazuje AUC (0.968) za AKI u asfiktčne novorođenčadi. Konačno Smertka i saradnici su ispitivali 73 novorođenčadi sa sepsom i 29 bez sepse [22]. Petoro (6.8%) septične novorođenčadi je razvilo AKI. Autori su zaključili da NGAL preciznije odražava ozbiljnost inflamatornog statusa od AKI, to jest da je NGAL više marker zapaljenja nego AKI. [22] U našoj studiji smo pokazali slično Ragallu [21] i saradnicima korist od sNGAL u ranoj detekciji AKI u novorođenčadi sa PNA. Ni jedan naš pacijent nije imao sepsu niti bilo koji drugi dokumentovani infektivni ili inflamatorni status i ovo jedinstveno povećanje vrednosti sNGAL se može pripisati samo AKI. Mi smo koristili na DAN3 sCr baziranu definiciju AKI imajući u vidu da u to vreme on bolje reflektuje bubrežnu funkciju novorođenčeta.

Serumski NGAL se slobodno filtrira preko glomerula, u velikoj meri se reapsorbuje u proksimalnom tubulu, pomoću efikasne megalin zavisne endocitoze. Direktan dokaz za ovu pojavu je sistemska injekcija obeleženog NGAL koji se slobodno filtrira u proksimalnom tubulu ali ga nema u urinu eksperimentalnih životinja. S toga je svaka urinarna ekskrecija NGAL rezultat oštećenja proksimalnog renalnog tubula, kada je onemogućena reapsorpciju NGAL, i/ili

de novo porast sinteze NGAL. Genske studije NGAL su pokazale brzu i masivnu produkciju NGAL (mRNA) u distalnim segmentima nefrona, posebno u debelom, ushodnom delu Henleove petlje i sabirnom duktusu. Izgleda da najveći deo frakcije urinskog NGAL čini ovaj NGAL protein sintetisan u distalnom nefronu. Bubrežni je jedini izvor sNGAL. U animalnim studijama direktno uzimanje uzorka iz ipsilateralne renalne vene nakon unilateralne ishemije, ukazuje da NGAL sintetisan u bubregu nije efikasno uveden u cirkulaciju, ali je obilno prisutan u ipsilateralnom ureteru. Ipak dobro je poznato da AKI rezultuje takođe dramatičnim porastom NGAL (mRNA) u udaljenim organima, posebno u jetri i plućima, i da hiperprodukovani NGAL oslobođen u cirkulaciju može napuniti udaljeni sistemski rezervoar (pool). Dodatni doprinos sistemskom rezervoaru AKI može se pripisati činjenici da je NGAL u akutnoj fazi reaktant i da može biti oslobođen iz neutrofila, makrofaga i drugih imunskih ćelija. Konačno svako smanjivanje GFR tokom AKI bi trebalo smanjiti renalni klirens NGAL sa posledičnom akumulacijom u sistemskoj cirkulaciji. Relativno podizanje nivoa sNGAL u toku i nakon AKI ostaje i dalje predmet novih istraživanja. Za sada se pouzdano zna da je sNGAL ushodno regulisan i oslobađa se iz bubrežnih tubula tokom oštećenja bubrega, da je biološki intermedijer u mehanizmu ishemijsko reperfusionog oštećenja bubrega. Gen za NGAL je značajno ushodno regulisan nakon ishemijskog i nefrotoksičnog oštećenja i da je protein prisutan u ćelijama distalnih tubula. NGAL može imati primarnu ulogu u tubularnom oporavku i korišćen je terapijski u reperfusiono - ishemijskom oštećenju u animalnim modelima [22]. Nedavne studije na animalnim modelima su ustanovile da je bubrežni primarni izvor NGAL u AKI. Sve koncentracije sNGAL su se povećale sa pogoršanjem oštećenja bubrega. Međutim NGAL kao biomarker AKI u opšte ima i neka ograničenja. Kod odraslih NGAL vrednosti su pod uticajem mnogih koegzistirajućih varijabli kao što su hronična bubrežna bolest (CKD), hronična hipertenzija, sistemske infekcije, inflamatorna stanja, anemija, hipoksija, maligniteti, hronične inflamacije. NGAL je prisutan u humanim aterosklerotskim plakovima i u aneurizmama abdominalne aorte, što utiče na povećanje nivoa plazma NGAL. Kod hroničnih bolesnika, NGAL nivoi su u pozitivnoj korelaciji sa težinom bubrežnog oštećenja. Ipak je porast plazma NGAL u svim nabrojanim situacijama generalno mnogo manji nego u AKI. Novorođenče nema ove koegzistirajuće varijable. Ograničenja NGAL kao AKI biomarkera naznačena su u publikovanim studijama koje ističu značaj starosti, odnosno uzrasta kod dece kao važan faktor učinka NGAL kao AKI biomarkera, naglašavajući njegovu bolju prediktivnu sposobnost u dece

(AUC-ROC ~ 0.93) nego u odraslih (AUC-ROC ~ 0.78). Deca, posebno novorođenčad su oslobođena mnogih multisistemskih poremećaja koji se registruju u odrasloj populaciji. Zato naš sNGAL predstavlja čist biomarker neonatalnog AKI. U naših ispitanika AUC-ROC za sNGAL u prvim satima života je iznosio (AUC-ROC ~ 0.72). Sa prilagođavanjem na, za novorođenački AKI najznačajnije varijable: gestaciju, porođajnu telesnu masu, pol, Apgar skor i bazni deficit, prediktivna sposobnost sNGAL je značajno porasla na vrednosti u prvom danu najviše u DAN₁₂ na (AUC-ROC ~ 0.80), značajno u DAN₁₄ na (AUC-ROC ~ 0.78) i u DAN₁₆ na (AUC-ROC ~ 0.77). To potvrđuje da je sNGAL biomarker u funkciji gestacijske i prenatalne dobi, kao i AS i BD.

Poređenja sNGAL i uNGAL i njihove sposobnosti da predvide AKI u pretermiskog novorođenčeta, posmatrana kroz vrednosti AUC-ROC pokazala su sledeće. U najranijoj tački merenja u uzrastu dva sata određene vrednosti AUC-ROC su veće za uNGAL nego za sNGAL: DAN₁₂ AKI grupa: (0.85 vs 0.72); DAN₁₂ AKIN1 grupa: (0.90 vs 0.70); DAN₁₂ AKIN2 grupa: (0.69 vs 0.61). Ovo je veoma značajan rezultat koji pokazuje značaj uNGAL i njegovu potencijalnu snagu da lako neagresivno odredi, dijagnostikuje najranije moguće AKI novorođenčeta već nakon prve mikcije, odnosno iz prvog izmokrenog urina. To praktično znači da bi prvi izmokreni urin bio veoma važan signal za dijagnozu. U kasnijim vremenskim odrednicama poređenje vrednosti AUC-ROC uNGAL i sNGAL naših ispitanika pokazuje značajno više vrednosti sNGAL u odnosu na uNGAL u svim ostalim tačkama merenja.

Rani porast vrednosti sNGAL može povećati svest o razvoju AKI. To bi vodilo u: opravdani napor da se intenzivira monitoring bubrežne funkcije, u ranu dijagnozu, veće izbegavanje nefrotoksičnih lekova, hipotenzije, hipovolemije i njihovog ranijeg tretmana. Pacijenti identifikovani pomoću ovih biomarkera treba da dobiju produžen intenzivan monitoring i veće mere za optimizaciju renalne perfuzije i hidracije, pomerajući rang hemodinamskih ciljeva na viši nivo, više vrednosti srednjeg krvnog pritiska (MBP) i srčanog autputa (CO). Nove terapijske mere kao što su antioksidativne, antiinflamatorne i antiapoptotičke terapije se ispituju. Rani biomarkeri novorođenačkog AKI otvaraju puteve za kontrolisane studije ovih intervencija u novorođenčadi. Naša studija ima veliku snagu jer je fokusirana na vrednostima NGAL u ranom periodu, neposredno po prijemu u NICU, najranijem neonatalnom dobu, prvim satima i/ili danima života novorođenčeta. To je period u kome pravovremeno izvedene specifične

intervencije mogu imati veći terapijski značaj. U ovom smislu posebno je vredan sNGAL pošto je dostupan nezavisno od diureze. Nadamo se da će rani biomarkeri napraviti revoluciju u oblasti AKI dijagnostike u odnosu na porast kreatinina. Najveće nade su da će unapređenja u primeni biomarkera u kliničkoj praksi, omogućiti bolju prevenciju, tretman i ishod AKI, nešto što je bilo razočaravajuće odsutno tokom prethodnih pola veka.

Najveću snagu ove studije čine; prvo ispitivanje velike grupe preterminske novorođenčadi sa PNA, drugo rigorozno poštovanje protokola u prikupljanju podataka, uzoraka za analizu koje je pratilo slepo merenje biomarkera, treće ispitivanje je započelo veoma rano u drugom satu života novorođenčeta, odmah nakon hipoksijsko-ishemijskog insulta. Na kraju rana identifikacija sNGAL u novorođenčadi koja su u riziku za razvoj AKI ili koji ga već imaju doprinosi poboljšanju njihovog lečenja i ishoda. Napokon i ako smo pokazali da sNGAL može imati ulogu u ranoj identifikaciji AKI još uvek nije jasno koliko signal ranog porasta sNGAL može imati uticaja u kliničkom radu i poboljšati ishod lečenja ove novorođenčadi.

Urinarni NGAL (uNGAL)

Dijagnostika urinarnih biomarkera ima neke prednosti u odnosu na serumske biomarkere naročito u vezi sa neinvazivnom prirodom uzimanja uzoraka i mogućnostima čestog uzorkovanja bez vađenja krvi što je za preterminsko novorođenče velika prednost. Urin je dragocen i najraniji biološki mesendžer oštećenja bubrega tokom perinatalnog perioda i kao jednostavno dobijen biološki materijal je idealan za određivanje vrednosti biomarkera. Kod novorođenčeta su otežavajuće okolnosti značajne: vreme kada se prvi urin pojavio, količina prvog izmokrenog urina, teškoće u sakupljanju urina u opšte a posebno prvog urina. Problem prvih mikcija je veoma kompleksan od toga da je prvo mokrenje često odloženo i oskudno, do toga da je kolekcija urina teška, neujednačena, nepredvidljiva, sklona kontaminaciji stolicom, krvlju, sekretima, gnojem ili drugim biološkim ili hemijskim materijalima. Urin daje šansu da se dijagnoza AKI postavi odmah pri prvom mokrenju u prvim satima života, pre ispoljavanja kliničke slike i pre porasta vrednosti drugih, pre svega konvencionalnih biomarkera AKI. I ako je urinarne biomarkere kod novorođenčeta nekada teško odrediti veoma rano, neposredno po rođenju, u prvim satima i danima života, ovu šansu moramo iskoristiti. Određivanje urinarnih biomarkera u prvom izmokrenom urinu mogao bi biti standard. Tako bi neinvazivni i rani pokazatelji neonatalnog AKI bili dostupni u pravom trenutku. Kako se uNGAL pokazao među

najboljima, kao odličan prediktor AKI njegovo određivanje bi moglo biti najraniji način dijagnoze neonatalnog AKI.

U delu ispitivanja uNGAL moramo naglasiti da su prvobitno izmerene vrednosti uNGAL izražene su u ng/ml (apsolutna vrednost). Ova vrednost je zatim standardizovana/normalizovana u odnosu na vrednosti urinarnog kreatinina (uCr) što je izraženo u (ng/mg uCr), metrički sistem, jer se uobičajeno koncentracije urinarnih biomarkera izražavaju kao odnos prema urinarnom kreatininu, normalizovan ili standardizovan odnos. Apsolutnu i standardizovanu vrednost metričkog sistema pokazuje Tabela 11. Vrednosti dobijene merenjem u metričkom sistemu konvertovali smo u SI sistem jedinica. Apsolutne i standardizovane vrednosti SI sistema pokazuje Tabela 11a. Apsolutne vrednosti SI sistema izražene su u (nmol/L) a standardizovane u (nmol/mmol uCr). Mnogi urinarni biomarkeri bubrežnog oštećenja, albumin i drugi, uobičajeno se prikazuju kao normalizovan odnos prema urinarnim koncentracijama kreatinina (uCr), što je prihvatljiviji prikaz varijacija, prema protoku urina. Pretpostavka je da je ekskrecija urinarnog kreatinina konstantna, tako da će promene ovog odnosa odražavati promene u izlučivanju biomarkera. Savremena kompjuterska simulacija kinetike kreatinina otkriva da normalizovani nivo biomarkera odražava tubularno oštećenje, što utiče na dinamične promene u koncentracijama urinarnog kreatinina i brzinu njegovog izlučivanja pri promenama jačine glomerulske filtracije. Stvarne vremenski definisane kolekcije urina u pacijenata sa promenljivim GFR i/ili kritičnom bubrežnom bolešću koji imaju varijabilne uCr koncentracije potrebno je odrediti svakom pacijentu. Normalizacija prema uCr, bi možda mogla rezultovati potcenjivanjem ili precenjivanjem brzine izlučivanja biomarkera u zavisnosti od kliničkog konteksta. Niže izlučivanje kreatinina u ambijentu AKI ili loše bubrežne funkcije može pojačati biomarker signal tubulskog oštećenja, čime se povećava njegova klinička korisnost. Promene u ekskreciji kreatinina međutim, komplikovaće određivanje vrednosti praga za biomarkere ili normalizaciju biomarkera za akutnu ili hroničnu bubrežnu bolest. Najprecizniji metod za kvantifikovanje biomarkera zahteva prikupljanje uzoraka urina u vremenski jasno definisanim periodima da proceni stvarnu brzinu izlučivanja pod uslovom da je biomarker stabilan u periodu prikupljanja. U našem ispitivanju u istim vremenskim tačkama su određivane vrednosti NGAL u krvi i urinu, kada god je to bilo moguće, u trenutku sakupljanja urina izvađena je i krv za analizu. Vreme za dijagnozu AKI je postavljeno veoma rano u drugom i četvrtom satu prvoga dana života (DAN₁₂ i DAN₁₄), i ako je jasno da sva novorođenčad neće imati diurezu

odmah ili rano po rođenju. Smatrali smo da bi propuštanjem nekog vremena mogli propustiti početni povišeni nivo biomarkera i kasniti u dijagnozi. Najraniji registrovan trenutak, izmeren inicijalni porast vrednosti biomarkera, bio je jedan od motiva i ciljeva ispitivanja. Većina ispitanika je transportovana u naš NICU iz porodilišta u gradu, neposredno po rođenju, a manji deo iz udaljenih porodilišta, krajem prvog ili početkom drugog dana života. Svakodnevna klinička praksa u NICU sa pretermijskom novorođenčadi suočena je sa AKI i njegovom relativno kasnom dijagnozom, zbog čega smo insistirali na ranom merenju biomarkera, pokušavajući da odredimo najranije moguće vreme za dijagnozu. Najmanji broj uzoraka urina je ostvaren u prvim satima prvog dana života (DAN₁₂), zbog toga i zaključci donešeni na malom broju uzoraka imaju ograničenu snagu, i ako su vrednosti AUC-ROC u ovim tačkama bile najbolje. Ističemo četvrti sat prvog dana ispitivanja (DOL₁₄), u kome smo uspeali regrutovati najviše ispitanika i dobili veoma značajne vrednosti. Ovaj interval daje nadu za neke buduće studije koje će uspeti da ostvare mnogo veći broj uzoraka i veću mogućnost za kompletno testiranje urinarnih biomarkera, u najranijim satima života. I ako su rigorozno poštovane odredbe iz protokola studije neki uzorci su ipak izgubljeni, bili minimalni, nedovoljni za analizu, kontaminirani ili prosuti. Sa još većom preciznošću i strpljenjem ovakav deo ispitivanja bi mogao biti uspešniji. Najveći napor u ovoj studiji učinjen je u sakupljanju urina. Posebno je teška kolekcija urina iz prvih mikcija, koje su često odložene, usporene i oskudne. Zbog toga mnoga novorođenčad i u našoj studiji nemaju uzorak urina u DAN₁₂ ili čak DAN₁₄. Na sreću urini sakupljeni u 2 ili 4 satu posle prijema u NICU, su prema koncentracijama uNGAL, bili dovoljno informativni za postavljanje dijagnoze AKI u asfiktinog pretermijskog novorođenčeta. Ovaj rad nudi podatke za obećavajuću ulogu urinarnih biomarkera u detekciji AKI pretermijske novorođenčadi. Dinamiku promena uNGAL u vremenu ispitali smo pomoću jednofaktorske analize varijanse, ANOVA, sa ponovljenim merenjima (Fisher's one-way analysis of variance ANOVA with repeated measurements).

•Analiza vrednosti uNGAL u svih pet tačaka merenja

Vrednosti uNGAL pokazuju da u svim vremenski jasno definisanim tačkama merenja uNGAL broj uzoraka nije bio jednak, naprotiv veoma je različit. To je objašnjeno teškoćama u uspostavljanju diureze u prvim satima, danima života, i problemima sa kolekcijom prvih

oskudnih količina urina. Ipak i u najranijim definisanim tačkama ispitivanja ostvarena su neka merenja.

a) ne-AKI i AKI dve osnovne grupe ispitanika, prikazuje promenu vrednosti uNGAL izmerene u svih pet tačaka merenja u sve ispitivane novorođenčadi. Pokazan je rani porast vrednosti uNGAL u prvom danu ispitivanja sa statistički značajnom razlikom između grupa u najvećem broju pojedinačnih tačaka merenja u DAN1₂ p=0.043; DAN1₄ p=0.001 i DAN1₆ p=0.016. Statistički značajna razlika se održava i u DAN3 p=0.048, a gubi dalje u vremenu u DAN7 p=0.151. Tabela 11.(a,b); Figura 9(a).

b) AKIN1 i AKIN2 kao AKI podgrupe prikazuju promenu vrednosti uNGAL pet definisanih tačaka merenja na sledeći način: Statistički značajna razlika između vrednosti uNGAL u ovim podgrupama izražena je u DOL1₄ p=0.005; DOL1₆ p=0.047, značajno više u AKIN2 nego AKIN1. U narednim tačkama merenja ta razlika između podgrupa nije statistički značajna: (F=3.412, p=0.069);

c) non-AKI, AKIN1 i AKIN2 prikazuje promenu uNGAL u svih pet tačaka merenja u svih ispitanika posmatranih kroz ove grupe. Razlike u vrednostima uNGAL statistički su značajne u

DAN1₂ [p=0.001(ne-AKIvsAKIN1); p=0.002 (ne-AKIvsAKIN2)]

DAN1₂ [p=0.001(ne-AKIvsAKIN1); p=0.002 (ne-AKIvsAKIN2)]

DAN1₄ [p=0.003(ne-AKIvsAKIN1); p=0.000 (ne-AKIvsAKIN2)]

DAN1₆ [p=0.27 (ne-AKIvsAKIN1); p=0.009 (ne-AKIvsAKIN2)]

(Multipla komparacija)

Posmatrane kroz vreme sve grupe imaju statistički veoma značajnu promenu uNGAL:

(F= 5.963, p= 0.004);

•Analiza vrednosti uNGAL u četiri tačke merenja

a) ne-AKI i AKI dve osnovne grupe ispitanika, prikazuje promenu vrednosti uNGAL izmerene u četiri tačke merenja (DAN1₄, DAN1₆, DAN3 i DAN7) u sve ispitivane novorođenčadi. Regstruje se statistički značajna razlika između vrednosti uNGAL u tri od četiri definisane tačke merenja: u DAN1₄ p=0.001; DAN1₆ p=0.016 DAN3 p=0.048. Analiza celokupnog

vremena ispitivanja pokazuje da je ta razlika u celini statistički veoma značajna: ($F=8.682$, $p=0.004$); Figura 7(a)

b) AKIN1 i AKIN2 prikazuje promenu vrednosti uNGAL u na sledeći način: vrednosti uNGAL rano rastu u prvom danu ispitivanja, značajno više u AKIN2 nego AKIN1. Taj porast je najveći u četvrtom satu prvog dana merenja gde je razlika među grupama je statistički visoko značajna DAN₁₄ $p=0.005$; i statistički značajana u DAN₁₆ $p=0.047$. Tokom vremena u narednim tačkama merenja ta razlika nije statistički značajna: ($F=3.412$, $p=0.069$); Figura 7(b)

c) ne-AKI, AKIN1 i AKIN2 prikazuje promenu uNGAL u četiri tačke merenja u svih ispitanika posmatranih kroz ove grupe. Razlike u vrednostima uNGAL statistički su značajne u:

DAN₁₂ [$p=0.001$ (ne-AKIvsAKIN1); $p=0.002$ (ne-AKIvsAKIN2)]

DAN₁₄ [$p=0.003$ (ne-AKIvsAKIN1); $p=0.000$ (ne-AKIvsAKIN2)]

DAN₁₆ [$p=0.27$ (ne-AKIvsAKIN1); $p=0.009$ (ne-AKIvsAKIN2)];(Multipla komparacija)

Posmatrane kroz vreme sve grupe imaju statistički veoma značajnu promenu uNGAL:

($F= 5.963$, $p= 0.004$); Figura 7(c)

•Analiza vrednosti uNGAL u tri tačke merenja

a)ne-AKI i AKI dve osnovne grupe ispitanika, prikazuje promenu vrednosti uNGAL

izmerene u tri tačka merenja (DAN₁₄, DAN₁₆, DAN₃) u sve ispitivane novorođenčadi. Registrujemo statistički značajne razlike u sve tri definisane tačke merenja: DAN₁₄ $p=0.001$; DAN₁₆ $p=0.016$ i DAN₃ $p=0.048$. Analiza celokupnog vremena ispitivanja pokazuje da je ta razlika u celini statistički veoma značajna: ($F=8.682$, $p=0.004$); Figura 8(a)

b) AKIN1 i AKIN2 prikazuje promenu vrednosti uNGAL u ispitanika koji su razvili AKI u podgrupama AKIN1 i AKIN2 u tri tačke merenja. Vrednosti uNGAL rano rastu u prvom danu ispitivanja, značajno više u AKIN2 nego AKIN1. Statistički značajna razlika beleži se u dve od tri istaknute tačke merenja: u DAN₁₄ $p=0.005$ i u DAN₁₆ $p=0.047$. U narednim tačkama merenja ta razlika nije statistički značajna: ($F=3.412$, $p=0.069$); Figura 8(b)

c) ne-AKI, AKIN1 i AKIN2 prikazuje promenu uNGAL u tri tačke merenja u svih ispitanika posmatranih kroz ove grupe. Razlike u vrednostima uNGAL statistički su značajne u:

DAN₁₂ [p=0.001 (ne-AKIvsAKIN1); p=0.002 (ne-AKIvsAKIN2)]

DAN₁₄ [p=0.003 (ne-AKIvsAKIN1); p=0.000 (ne-AKIvsAKIN2)]

DAN₁₆ [p=0.27 (ne-AKIvsAKIN1); p=0.009 (ne-AKIvsAKIN2)]

Multipla komparacija. Posmatrane kroz vreme sve grupe imaju statistički veoma značajnu promenu uNGAL: (F= 5.963, p= 0.004); Figura 8(c)

Kako razlike u koncentracijama uNGAL u vremenu mogu biti rezultat i drugih opštih karakteristika, a ne samo vremena, postnatale dobi novorođenčadi, ova analiza je prilagođena (adjusted) na kovarijanse: pol, gestaciju, AS, porođajnu telesnu masu i bazni deficit, pomoću jednofaktorske analize kovarijanse (ANCOVA) sa ponovljenim merenjima. Ađastiranje je urađeno na: pol, gestaciju, AS, porođajnu telesnu masu i bazni deficit na osnovu Pirsonovih koeficijenata korelacije, koji su pokazali da su ove karakteristike ispitanika visoko povezane sa pojavom i ishodom AKI kod novorođenčeta. Tabela 11_a i 11_b; Figura 7,8,9.

NGAL se sintetiše u sistemskom i renalnom bazenu. Poznato je da se NGAL u bubregu sintetiše u uzlaznom segment Henleove petlje i sabirnim kanalima i uglavnom reapsorbuje u proksimalnom tubulu, efikasnom megalin zavisnom endocitozom [59]. Povećanje koncentracije NGAL verovatno se javlja kada postoji oštećenje proksimalnog tubula bubrega i/ili povećanje sinteze u distalnom nefronu. Ishemijski stres tokom asfiksije dominantan je etiološki faktor koji utiče na AKI i integritet proksimalnog tubula novorođenčeta. Dakle uNGAL je odgovarajući marker za AKI uzrokovan PNA. U literaturi se javljaju podaci o tome da uNGAL zavisi od gestacione i postanatalne dobi i porođajne telesne mase [28]. Kontrola ovih veoma važnih pridruženih varijabli je neophodna kako bi se osigurala tvrdnja da veze između urinarnih biomarkera i AKI ishoda nisu samo odraz prematuriteta. To je bio razlog zašto smo uradili regresionu analizu za kontrolu ovih potencijalnih pridruženih varijabli, /konfaundersa/. Kada je u ovo uključeno i preživljavanje novorođenčadi kao važna varijabla, pokazano je da ovi biomarkeri mogu da predvide AKI kao pojavu i njegovu težinu, nezavisno od porođajne telesne mase ili gestacijske dobi. Od 2003. godine Mishra i saradnici su ukazali na značaj uNGAL kod pacijenata posle kardiohirurgije [22,23,112]. Od tada se broj radova rapidno povećava i

potvrđuje ulogu uNGAL u predviđanju AKI [9,24,28]. Prema našim saznanjima samo je nekoliko autora pokazalo značaj uNGAL u pretermnske novorođenčadi [34,35]. UNGAL se meri u određenoj zapremini urina i izražava kao apsolutna vrednost u mg/L ili kao standardizovana/normalizovana vrednost u odnosu na vrednost urinarnog kreatinina [75].

- Standardizovani uNGAL:

Urin predstavlja veoma atraktivan biološki materijal za određivanje biomarkera, međutim da bi se dobili validni podaci za neki urinarni biomarker i da bi on bio kvalitetan mora se prevazići niz teškoća. Jedan od početnih problema koji se mora prevazići jeste normalizacija urinarnog uzorka prema razlikama u razblaženju urina tokom 24 satne diureze. Uobičajeno su biomarkeri u uzorcima urina normalizovani prema koncentracijama kreatinina u urinu i taj odnos je konstantan u zdravom bubregu. Urinarni biomarkeri kao što su albumin i drugi biomarkeri burežnog oštećenja, često se prikazuju kao normalizovan/standardizovan odnos prema urinarnim koncentracijama kreatinina (uCr), što kontroliše varijacije prema protoku urina. Promene ovog odnosa odražavaju promene u izlučivanju biomarkera [1]. Korišćenjem kompjuterske simulacije kinetike kreatinina, otkrili smo da se na normalizovani nivo biomarkera odražava tubularno oštećenje što će uticati na dinamične promene u koncentracijama urinarnog kreatinina i brzinu njegovog izlučivanja pri promenama jačine glomerulske filtracije. Kod hospitalizovanih pacijenta se mogu odrediti stvarne vremenski definisane kolekcije urina sa promenljivim GFR i/ili kritičnom bolešću koji su izloženi varijabilnim uCr koncentracijama [113]. Korisno je razmotriti determinante urinarnog kreatinina (uCr). Ekskrecija i koncentracija urin kreatinina je u funkciji glomerulske filtracije. Kreatinin se slobodno filtrira u glomerul i luči u različitom stepenu u slučaju AKI, kreatinin takođe može da se vrati (backleak) preko oštećenog tubulskog epitela nazad u sistemska cirkulaciju [14]. Stoga se izlučivanje kreatinina u urinu može opisati kao:

$$\underline{[SCr] \times GFR + T\text{Scr} - BCr = [UCr] \times UFR}$$

SCr - serum creatinine concentration - koncentracija kreatinina u serumu

GFR- glomerular filtration rate - glomerularna filtracija

TScr- tubular secretion rate of creatinine - tubularna sekrecija kreatinina

BCr - backleak rate of creatinine - povratno izlučivanje kreatinina

UCr - urinary creatinine concentration - urinarna koncentracija kreatinina

UFR- urinary flow rate-protok urina

U stabilnim uslovima, zanemarivanje tubularne sekrecije i povratnog curenja kreatinina u cirkulaciju je obrnuto proporcionalno urinarnom protoku urina. Takođe urinarne koncentracije bilo kog biomarkera su obrnuto proporcionalne protoku urina (UFR) u odnosu na ukupno izlučivanje biomarkera. Normalizacija urinarnog biomarkera na uCr pod stabilnim uslovima u odnosu na varijacije UFR nema nikakav efekat na vrednost biomarkera ili brzinu izlučivanja kreatinina. Ipak pri normalizaciji je potreban oprez u tumačenju i treba znati da: najmanje u četiri klinička uslova normalizacija na [uCr] može biti pogrešna za urinarne biomarkere. Kada se uporede koncentracije urinarnih biomarkera u pojedinaца:

1. sa različitim stopom stvaranja kreatinina ili ekstrarenalne degradacije kreatinina
2. kada je GFR menja iz stabilnog stanja
3. kada se menja sekrecija kreatinina
4. kada se menja tubularni backleak kreatinina

Ove analize su izvedene da istraže potencijalne predrasude vezane za normalizaciju uCr usled promena u GFR empirijski u pacijenata sa AKI ili u riziku od AKI, i iz teorijske perspektive koristeći kompjutersku simulaciju kinetike kreatinina. Mi smo koristili termin klirens kreatinina da obuhvati promene u GFR, tubularnoj sekreciji i tubularnom back leak kreatinina (povratno tubularno curenje kreatinina) [113]. Zbog toga je faktor normalizacije veoma važan.

U ovom odeljku predstavljene su apsolutne i standardizovane vrednosti uNGAL. Tabele 1 i 2.

Shodno tome mi smo prikazali standardizovane vrednosti uNGAL prema urinarnom kreatininu (uCr). Sve vrednosti uNGAL u ovom poglavlju predstavljaju standardizovane vrednosti u odnosu na urinarni kreatinin (uCr). Takođe smo prikazali standardizovane vrednosti u oba sistema; metričkom i SI sistemu jedinica (metric units i SI units). Standardizovane vrednosti su imale bolji AUC-ROC i bolju sposobnost da predvide AKI od apsolutnih vrednosti.

Od svih ispitivanih biomarkera u našoj studiji najbolji AUC-ROC je imao uNGAL bolji od svih drugih ispitivanih urinarnih i serumskih biomarkera. U prvom danu DAN₁₂ AUC-ROC za uNGAL iznosio je 0.90, Tabela 3; Figura 3. To je najveća dostignuta vrednost jednog AUC-ROC u

našem ispitivanju. Posebno značajan rezultat dale su univarijantna i multivarijantna regresiona analiza koje su pokazale kako je porast uNGAL povećavao rizik od AKI i sam a posebno nakon ađastiranja na pridružene varijable; pol, gestaciju, Apgar skor i porođajnu telesnu masu. To značajno potvrđuje da vrednosti biomarkera uNGAL zavise od gestacijske zrelosti, porođajne telesne mase, postanatalne dobi i acido-baznog statusa. Udružen sa ovim prediktorskim varijablama uNGAL je poboljšao svoju predikciju AKI.

AUC-ROC u AKIN1 grupi u DAN1₂ sa AUC= 0.90[CI95%(0.63-0.99)]p=0.000, što je po klasifikaciji Mc Naill odličan! DAN1₆ Figura 2 b. Po istoj klasifikaciji vrlo dobar AUC je u AKI grupi ispitanika u DAN1₂ i iznosi AUC=0.85[CI95%(0.60-0.97)] p=0.000. Figura 1a, pokazuje AKI grupu i AUC-ROC u njoj. Učinak NGAL merenog u različitim vremenskim periodima kao prediktora za razvoj AKI u grupama (non-AKI/AKIN1/AKIN2) prikazan je u Tabeli 3 i Figuri 2. AUC-ROC je bio savršen u predviđanju AKI u AKIN1 u DAN1₂ i DOL1₂ (0.85 i 0.90 ovim redom), dok je bio dobar za predviđanje AKI u grupi DAN1₄ kao i DAN1₂ i DAN1₆. Istovremeno je uNGAL bio koristan u predviđanju AKIN2.

U zaključku ovog dela diskusije ponovo ističemo da je najveći napor u ovoj studiji učinjen je u sakupljanju urina, posebno iz prve mikcije, koji je dragocen i najraniji biološki mesendžer eventualnog oštećenja bubrega, tokom perinatalnog perioda. Precizno merenje i iščekivanje prve diureze je pokazalo da mnoga novorođenčad zbog odložene ili usporene prve mikcije nemaju očekivani uzorak urina u DAN1-2h ili čak DAN1-4h. Na sreću urini sakupljeni u 2 ili 4 satu posle prijema u NICU, su po koncentracijama uNGAL, bili dovoljno informativni za postavljanje dijagnoze AKI u asfiktičnog preterminskog novorođenčeta.

Odnosi sNGAL / uNGAL

Deo ove analize odnosi se na paralelnu studiju vrednosti sNGAL i uNGAL u ispitivanim grupama non-AKI/AKI i podgrupama, AKIN1/AKIN2. Specifičnost ove analize je u tome što se istovremeno prikazuju vrednosti sNGAL i uNGAL u pojedinačnim grupama ne-AKI/AKI i podgrupama AKIN1/AKIN2. U osnovnim grupama ispitanika ne-AKI i AKI vrednosti sNGAL su bile značajno veće od vrednosti uNGAL. Ta razlika statistički je bila veoma značajna u AKI grupi. Ova analiza odnosa sNGAL/uNGAL pokazuje da su vrednosti serumskog sNGAL bile značajno više nego vrednosti urinarnog uNGAL, u AKI grupi kao i u podgrupama AKIN1 i

AKIN2, i svim vremenima. Unutar grupne razlike (sNGAL vs uNGAL) su često bile statistički veoma značajne, uvek sa statistički značajno većom vrednošću sNGAL u odnosu na uNGAL. Analiza međugrupnih razlika je pokazala da one često nisu statistički značajne, posebno u odnosu na uNGAL. Razlike u vrednostima urinarnog uNGAL u: ne-AKI vs AKI u svim analiziranim vremenima nisu bile statistički značajne Figura 1. (a,b,c,d,e), kao ni u (AKIN1 vs AKIN2) Figura 2. (a,b,c,d,e), kao ni u (ne-AKI vs AKIN1 vs AKIN2). Figura 3(a,b,c,d,e). U delu analize koja se odnosi na uNGAL sigurno da značajan faktor ograničenja jeste mali broj uzoraka u ranim tačkama ispitivanja. Serumski NGAL je i u međugrupnoj analizi pokazao veći statistički značaj: (non-AKI vs AKI): DAN1₂, p=0.001; DAN1₄, p=0.001; DAN1₆, p=0.018, Figura 1. (a,b,c), Zatim u AKIN1 vs AKIN2: DAN1₄, p=0.035, Figura 2. (b), zatim u (ne-AKI vs AKIN1 vs AKIN2): DAN1₄, p=0.000; DAN1₆, p=0.020, Figura 3. (b, c). Moguća objašnjenja su: prvo, da je serumski NGAL bolji, pouzdaniji i sigurniji rani marker AKI u pretermiskog novorođenčeta drugo, da je broj uzoraka sNGAL, gotovo maksimalan u svim merenjima, omogućio validniju analizu, zaključke i predikciju. U zaključaku ovog dela diskusije sNGAL u poređenju sa uNGAL je raniji i bolji prediktor AKI u prevremeno rođenog deteta sa APN.

U zaključku diskusije ističemo najveći napor u ovoj studiji učinjen je u sakupljanju urina, posebno iz prve mikcije, koji je dragocen i najraniji biološki mesendžer o eventualnom oštećenju bubrega, tokom perinatalnog perioda. Precizno merenje i iščekivanje prve diureze je pokazalo da mnoga novorođenčad zbog odložene ili usporene prve mikcije nemaju očekivani uzorak urina u DAN1-2h ili čak DAN1-4h. Na sreću urini sakupljeni u 2 ili 4 satu posle prijema u NICU, su po koncentracijama uNGAL, bili dovoljno informativni za postavljanje dijagnoze AKI u asfiktičnog pretermiskog novorođenčeta.

KIM-1(Kidney injury molecule-1) - Molekul-1 bubrežnog oštećenja

Kao i većina biomarkera, KIM-1 je prvobitno ispitivan na animalnim modelima, zatim u humanoj populaciji kod odraslih, kasnije u minimalom broju studija kod dece nakon kardio-hirurgije. Nakon opsežnih predkliničkih studija KIM-1 je prihvaćen od strane Food Drug Assotiation (FDA) i Evropske medicinske agencije, kao visoko specifičan i senzitivan urinarni biomarker, u AKI izazvanim nefrotoksičnim dejstvom lekova, u predkliničkim studijama i pojedinačnim slučajevima [19,20,21]. Prethodne studije kod odraslih rezultovale su zadovoljavajućim vrednostima AUC -ROC za KIM-1, koji je iznosio oko 0.80. U studiji Han i

saradnika izvedenoj u grupi od 90 odraslih pacijenata nakon kardiohirurgije 36 pacijenata je razvilo AKI 72 sata nakon operacije. Ispitivanje pojedinačnih biomarkera u ovih pacijenata je pokazalo u trećem postoperativnom satu sledeće, skromne vrednosti AUC-ROC: KIM-1= 0.68 i 0.65; NAG= 0.61 i 0.63; uNGAL= 0.59 i 0.65. Kombinacija tri biomarkera KIM-1, NAG i uNGAL povećala je osetljivost za ranu predikciju AKI do značajnih 0.75 i 0.78 [70]. U malim kontrolisanim “case control” studijama od 40 dece podvrgnute operacijama srca 20 je imalo AKI definisan kao 50% serumskog kreatinina a 20 je bilo bez AKI. U AKI grupi nivoi KIM-1 su bili povećani sa AUC-ROC 0.83 u dvanaestom postoperativnom satu. Već tu se KIM-1 pokazao kao obećavajući kandidat za ulazak na urinarni panel AKI.

Kod novorođenčadi, posebno pretermijske, tek su zabeležene početne studije. U tom smislu ova studija je specifična i značajna, u ispitivanju uloge KIM-1 u ranoj detekciji AKI kod pretermijske novorođenčadi sa perinatalnom asfiksijom, i ako su njeni rezultati u ovom delu skromni [5].

U našem ispitivanju vrednosti KIM-1 određivane su prema istom protokolu studije, zajedno sa drugim biomarkerima. Kao urinarni biomarker KIM-1 je meren u urinu asfiktične pretermijske novorođenčadi. Slično problemima svojstvenim ispitivanju drugih biomarkera urin-panela, u ovom delu pri ispitivanju KIM-1, imali smo iste teškoće u sakupljanju urina. Ovo je posebno izraženo u najranijim tačkama merenja u prvom danu, DAN₁₂ kada je realizovan mali broj uzoraka, samo 17 (non-AKI: 5 i AKI: 12), za određivanje KIM-1.

Rani porast vrednosti KIM-1 u urinu ispitivane novorođenčadi registrovan je u AKI; DAN₁₄: (699.99 ± 431.57) pg/ml u zadovoljavajuće velikoj grupi ispitanika od 72 novorođenčadi. U ovoj tački merenja odnos non-AKI vs AKI je bio statistički veoma značajan i iznosio p=0.001. Statistički značajne razlike među analiziranim grupama non-AKI vs AKI registruju se i u DOL₁₆: p=0.032, kada je broj ispitanika bio 30. Tabela 2. U ostalim tačkama ispitivanja nije bilo statistički značajne razlike između analiziranih grupa i podgrupa. Takođe registrovane su visoke vrednosti KIM-1 u obe podgrupe AKIN₁ i AKIN₂.

Vrednosti AUC-ROC za KIM-1 u grupama i podgrupama ispitivane pretermijske novorođenčadi prikazane su u Tabeli 6. Najveća sposobnost KIM-1 da predvidi AKI u pretermijskog novorođenčeta zabeležena je u DAN₁₄ sa AUC= 0.70[CI95%(0.60-

0.81)]p=0.001 i DAN₁₆ sa AUC=0.63[CI95%(0.47-0.78)]p=0.014 i DAN₃ sa AUC=0.60[CI95%(0.48-0.71)]p=0.016. Istovremeno KIM-1 bio koristan u predviđanju AKIN2. Tu je zabeležen manje značajan ali dobar AUC-ROC za KIM-1 u AKIN2 grupi u: DAN₁₄ AUC=0.67[CI95%(0.52-0.81)]p=0.065. i DAN₁₆ AUC=0.66[CI95%(0.42-0.90)]p=0.300. (Tabela 16. Figura 18). Strogo ceneći ovo nisu optimalne, ali su sigurno značajne vrednosti AUC-ROC koje sa visokom pouzdanošću mogu predvideti AKI. Takođe jasno je da odsustvo merenja i/ili mali broj merenja, u najranijim tačkama studije umanjuje značaj ovih rezultata. Bolju predikciju AKI pomoću urinarnog KIM-1 očekujemo u narednim multicentričnim studijama na velikim uzorcima ispitanika.

U Tabeli 4. su sumirane univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza. Rizik od AKI progresivno je rastao sa sa porastom vrednosti KIM1 u prvom danu, 4 i 6 satu po prijemu: [OR=1002 sa 95%CI=(1.001-1.003)] p=0.002; i OR=1.002 sa [95%CI=(1.000-1.003)] p=0.041 tim redom. Multivarijantna logistička regresiona analiza otkrila je da su visoke KIM1 vrednosti u 4 i 6 satu prvog dana bili značajni prediktori AKI nakon “ađastiranja” za pridružene varijable OR=1.002 sa [95%CI(1.001-1.004)] p=0.001; i OR=1002 sa [95%CI(1.000-1.004)] p=0.037. Ađastiranje je izvršeno na kovarijante POL, GES, AS, PTM i BD. Kada su AKIN1 i AKIN2 grupe uzete u obzir onda ovaj marker nije bio prediktor AKIN1 i AKIN2 niti sam niti ađastiran.

Prednost KIM-1 nad NGAL je ta da je on specifičniji za ishemijske i nefrotoksične povrede bubrega i nije značajno izmenjen hroničnom bubrežnom bolešću, niti infekcijama urinarnog trakta. Najverovatnije da će se NGAL i KIM-1 javiti kao sledeći biomarkeri AKI, sa NGAL kao najosetljivijim pokazateljem prisutnim u najranijim vremenskim tačkama, a KIM-1 kao značajnim specifikatorom u malo kasnijim vremenskim tačkama.

Alfa-1 mikroglobulin (α 1-M)

Alfa-1 mikroglobulin (α 1-M), je ispitivan u ovoj studiji na isti način kao i ostali biomarkeri, po istom protokolu studije. Rezultati ovog dela ispitivanja značajno su skromniji u odnosu na rezultate za NGAL i KIM-1. Ipak nisu zanemarljive vrednosti AUC-ROC u prvom danu života u AKI grupi: četvrtom i šestom satu: 0.60; 0.63 , i dalje u trecem 0.61 i sedmom danu života 0.65. Takođe visoke vrednosti α 1-M, su bili značajni prediktori AKI u DAN₁₄ sami

OR = 1.002 [95%CI(1.001-1.003)] p=0.002 i nakon ađastiranja na pridružene varijable OR = 1.015 [95%CI(0.988-1.043)] p=0.091, takođe u DAN3 sami OR = 1.026 [95%CI(1.996-1.058)] p=0.278 i nakon ađastiranja: OR = 1.017 [95%CI(1.985-1.050)] p=0.298.

Beta -2 mikroglobulin (β 2-M)

Sposobnost beta-2 mikroglobulina da predvidi AKI kod preterminske novorođenčadi značajna je u AKIN2 grupi i iznosi u ispitivanim tačkama: 0,72, 0,90, 0,74, 0,80, 0,75. tim redom. AUC-ROC 090 u DAN1₄ je numerički izvanredna vrednost, ali značaj je umanjen činjenicom da je to vrednost određena na jednom jedinom uzorku. Tri vrednosti AUC-ROC za DAN1₆= 0,74, DAN3 =0,80, DAN7=0,75 određene su na uzorku od 12 ispitanika, (što je 50% AKIN2 podgrupe) su sasvim dobre i zadovoljavajuće vrenosti. Dalje multivariaciona regresiona analiza je pokazala da najveći značaj za predviđanje AKI u preterminske novorpođenčadi ima β 2-M nakon ađastiranja na pridružene varijable najznačajnije za novorođenče i razvoj AKI kod njega a to su: pol, gestacija, Apgar skor, porođajna telesna masa i bazni deficit. Nakon ađastiranja ovaj marker je bio značajan marker AKI u AKI grupi u svim vremenima merenja. Takođe u AKIN2 podgrupi β 2-M je bio značajan biomarker AKI u četiri tačke merenja od četvrtog sata prvog dana ispitivanja do sedmog dana Tabela 34. To ukazuje na značaj prilagođavanja na navedene varijable, koje imaju veliki uticaj na vrednosti ovog bimarkera i njegovu zavisnost od njih. Kao i drugi biomarker i β 2-M je u funkciji postnatalne i gestacijske dobi, Apgar skora i baznog deficita kao pokazatelja perinatalne asfiksije. Sve rezultate β 2-M treba uzeti sa određenim ograničenjem vezanim za urinarne biomarkere uopšte , jer je broj uzoraka često bio mali nedovoljan ili čak nije ostvaren. Čak i najboljim rezultati na minimalnom broju uzoraka značaj je umanjen i ne može se generalno tumačiti. To ponovo ističe potrebu za velikim multicentričnim studijama.

U zaključku diskusije: AKI je sindrom sa ozbiljnim neposrednim, ranim i kasnim posledicama. Drugi pristup da se poboljša AKI dijagnoza jeste kombinacija više biomarkera. Askenazi i saradnici su procenjivali više, 8 urinarnih biomarkera: NGAL, IL-18, KIM-1, OPN, B2mG, CysC [17]. Oni su ispitali kombinovane sposobnosti ovih biomarkera za predviđanje AKI i mortaliteta u VLBW novorođenčadi i pokazali da kombinacija tri biomarkera nije bolja od njihove izolovane, pojedinačne upotrebe. Međutim ova studija je samo studija jedne uske specifične, jasno definisane grupe bolesnika. Nismo mogli identifikovati studije koje procenjuju

ulogu KIM-1 posebno u neonatalnoj populaciji. Samo u studiji Askenazija procenjena je uloga KIM1-a kao biomarkera AKI ali ne samostalno nego u kombinaciji sa drugim biomarkerima.

U našem ispitivanju najbolje cutoff vrednosti je imao uNGAL. Zavidne vrednosti cutoff imao je i sNGAL. Takođe AUC-ROC vrednosti koje smo zabeležili kod drugih biomarkera su veoma korisne u predviđanju AKI. Veći efekat i bolju korist u predviđanju smo dobili kombinacijom biomarkera.

Naša sposobnost da rano dijagnostikujemo AKI možda će se poboljšati najboljom kombinacijom više biomarkera, što bi poboljšalo terapijske i preventivne mere i AKI prognozu. Neke studije su uključile procenu biomarkera kod novorođenčadi i starije dece [18]. Granične (cut-off) vrednosti mogu biti različite za decu i novorođenčad, različite za novorođenčad različitih gestacija, PTM i postnatalne dobi. Nismo mogli identifikovati studije koje procenjuju ulogu KIM-1 posebno u neonatalnoj populaciji. Samo u studiji Askenazija procenjena je uloga KIM-a kao biomarkera AKI ali ne samostalno nego u kombinaciji sa drugim biomarkerima [117].

6.ZAKLJUČAK

U skladu sa ciljevima našeg istraživanja a na osnovu rezultata dobijenih statističkom analizom, izvedeni su sledeći zaključci:

- 1. U preterminske novorođenčadi sa perinatalnom asfiksijom učestalost AKI je visoka i iznosi 67.60 %.**
- 2. Prema AKIN klasifikaciji najveći broj preterminske novorođenčadi sa perinatalnom asfiksijom 83.60% je razvilo AKIN1 a AKIN2 16.40%, dok najteže stanje AKIN3 nije registrovano.**
- 3. Dijagnoza AKI postavljena je na osnovu vrednosti serumskog kreatinina**
Vrednosti serumskog kreatinina bile su u pozitivnoj korelaciji sa vrednostima novih biomarkera.
- 4. Dijagnoza AKI na osnovu konvencionalnih biomarkera kasni 48-72 sata po rođenju. Vrednosti novih testiranih urinarnih i serumskih biomarkera imaju značajan porastu u prvim satima života, kod preterminskog novorođenčeta sa AKI i perinatalnom asfiksijom.**
- 5. Prediktivna vrednost testiranih biomarkera AKI u preterminske novorođenčadi sa perinatalnom asfiksijom u prvim satima života je potvrđena visokim vrednostima AUC-ROC.**

- 6. Biomarkeri AKI pretermiskog novorođenčeta su u zavisnosti od gestacijske i postanatalne dobi, Apgar skora i porođajne telesne mase.**

- 7. Novi biomarkeri neonatalnog AKI je potrebno uvesti u standardni dijagnostički protokol u pedijatrijskim intenzivnim jedinicama i neonatološkim odeljenjima**

- 8. Potrebno je sprovesti obimniju multicentričnu studiju, koja bi potvrdila značaj novih biomarkera u dijagnozi AKI i dala precizne smernice za upotrebu biomarkera u svakodnevnoj kliničkoj praksi.**

7. LITERATURA

1. Shah P, Riphagen S, Beyene J, Perlman M. Multiorgan dysfunction in infants with post-asphyxial hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004;89(2):F 152-155.
2. Andreoli SP. Acute kidney injury in children. *Pediatr Nephrol.* 2009;24:253-63.
3. Askenazi DJ, Ambalavanan N, Goldstein SL. Acute kidney injury in critically ill newborns: what do we know? What do we need to learn? *Pediatr Nephrol.* 2009; 24(2):265-274.
4. Kaur S, Jain S, Saha A, Chawla D, Parmar VR, Basu S, Kaur J. Evaluation of glomerular and tubular renal function in neonates with birth asphyxia. *Ann Trop Paediatr.* 2011;31(2):129-134.
5. Gallini F, Maggio L, Romagnoli C, Marrocco G, Tortorolo G. Progression of renal function in preterm neonates with gestational age < or = 32 weeks. *Pediatr Nephrol.* 2000;15(1-2):119-24.
6. Askenazi DJ, Griffin R, McGwin G, Carlo W, Ambalavanan N. Acute kidney injury is independently associated with mortality in very low birthweight infants: a matched casecontrol analysis. *Pediatr Nephrol.* 2009;24(5):991-997.
7. Karlowicz MG, Adelman RD. Nonoliguric and oliguric acute renal failure in asphyxiated term neonates. *Pediatr Nephrol.* 1995;9(6):718-722.
8. Rogers S, Witz G, Anwar M, Hiatt M, Hegyi T. Antioxidant capacity and Oxygen Radical Diseases in the Preterm Newborn. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2000;154:544-548
9. Buonocore G, Perrone S, Longini M, Terzuoli L, Bracci R. Total Hydroperoxide and Advanced Oxidation Protein Products in Preterm Hypoxic Babies. *Pediatric Research.* 2000; 47: 221-221; doi:10.1203/00006450-200002000-00012
10. Saugstad OD. Oxygen toxicity in the neonatal period. *Acta Paediatr.* 1990;83:692-695
11. Pitkanen OM, Hallman M, Andersson S. Correlation of free oxygen radical-induced lipid peroxidation with outcome in very-low-birthweight infants. *J Pediatr.* 1993;116:760-764
12. Soni SS, Ronco C, Katz N, Cruz DN. Early diagnosis of acute kidney injury: the promise of novel biomarkers. *Blood Purif.* 2009; 28(3):165-174.
13. Wald R, Quinn RR, Luo J, Li P, Scales DC, Mamdani MM, Ray JG. Chronic dialysis and death among survivors of acute kidney injury requiring dialysis. *JAMA* 2009;302:1179-1185.

14. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, et al. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 2004;8:R204-12.
15. Akcan-Arikan A, Zappitelli M, Loftis LL, Washburn KK, Jefferson LS, Goldstein SL. Modified RIFLE criteria in critically ill children with acute kidney injury. *Kidney Int* 2007;71:1028-35.
16. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007;11:R31.
17. Ricci Z, Netto R, Garisto C, Iacoella C, Favia I, Cogo P. Whole-blood assessment of neutrophil gelatinase-associated lipocalin versus pRIFLE for acute kidney injury diagnosis and prognosis after pediatric cardiac surgery: cross-sectional study. *Pediatr Crit Care Med* 2012;13:667-70.
18. Schwartz GJ, Munoz A, Schneider MF, et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:629-37.
19. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Supplement* 2012;2:1-138.
20. Lameire N The Definitions and Staging Systems of Acute Kidney Injury and Their Limitations in Practice. *Arab Journal of Nephrology and Transplantation* 2013;6:145-52
21. Arif Khwaja KDIGO Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury. *Nephron Clin Pract* 2012;120:c179-c184 DOI:[10.1159/000339789](https://doi.org/10.1159/000339789)
22. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury. *Kidney Int* 2012; supp 12(1):1-138
23. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005;365(9466):1231-8.
24. Drucker E, Krapfenbauer K. Pitfalls and limitations in translation from biomarker discovery to clinical utility in predictive personalized medicine. *EPMA Journal* 2013;4:7 <http://www.epmajournal.com/licenses/by/2.0>
25. Wasung ME, Chawla LS, Madero M. Biomarkers of renal function, which and when?

26. Clin Chim Acta. 2014; 438C:350-357. Xue JL, Daniels F, Star RA, et al. Incidence and mortality of acute renal failure in medicare beneficiaries, 1992 to 2001. J Am Soc Nephrol 2006;17:1135-42.
27. Vachvanichsanong P, Dissaneewate P, Lim A, McNeil E. Childhood acute renal failure: 22-year experience in a university hospital in southern Thailand. Pediatrics 2006;118:786-91.
28. Askenazi DJ, Feig DI, Graham NM, Hui-Stickle S, Goldstein SL. 3-5 year longitudinal follow-up of pediatric patients after acute renal failure. Kidney Int 2006;69:184-9.
29. Schneider J, Khemani R, Grushkin C, et al. Serum creatinine as stratified in the RIFLE score for acute kidney injury is associated with mortality and length of stay for children in the pediatric intensive care unit. Crit Care Med 2010;38:933-9.
30. 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.
31. Basu RK, Wheeler D. Approaches to the Management of Acute Kidney Injury in Children. Recent Patents on Biomarkers 2011;1:49-59.
32. Bazerra CT, Vaz Cunha LC, Liborio AB. Defining reduced urine output in neonatal ICU: importance for mortality and acute kidney injury classification. Nephrol Dial Transplant 2013; 31(4):901-9
33. Euan Noble, David W. Johnson. Automated laboratory reporting of estimated glomerular filtration rate: is it good for the health of patients and their doctors? Biochemia Medica 2007;17(1):16-28. <http://dx.doi.org/10.11613/BM.2007.003>
34. Levey AS, Coresh J, Greene T, Marsh J, Lesley A.S, Kusek JW, Lente V.F. Expressing the Modification of Diet in Renal Disease Study Equation for Estimating Glomerular Filtration Rate with Standardized Serum Creatinine Values. Clinical Chemistry 2007;53(4):766-772
35. Naylor S. Biomarkers: current perspectives and future prospects. Expert Rev Mol Diagn 2003;3:525-529.
36. Petrović S, Bogavac-Stanojević N, Lakić D, Peco-Antić A, Vuličević I, Ivanišević I, Kotur-Stevuljević J, Jelić-Ivanović Z. Cost-effectiveness analysis of acute kidney injury biomarkers in pediatric cardiac surgery. Biochemia Medica. 2015;25(2):262-271. <http://dx.doi.org/1011613/MB.2015.027>
37. Mayeux Richard. Biomarkers: Potential Uses and Limitations. NeuroRx. 2004;1(2):182-188. doi: [10.1602/neurorx.1.2.182](https://doi.org/10.1602/neurorx.1.2.182)
38. Mayeux R, Saunders AM, Shea S et al. Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease Centers Consortium on apolipoprotein E and Alzheimer's disease. N Engl J Med 1998;338:506-511.

39. Haleem JI, Conrads TP, DaRue A, Tirumalai PR, Veenstra TD. SELDI-TOF MS for Diagnostic Proteomics. *Analytical Chemistry* 2003;1:149A-155A
40. Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC, Devarajan P. Differential gene expression following early renal ischemia-reperfusion. *Kidney Int* 2003; 63:1714-1724
41. Nguyen MT, Ross GF, Dent CL, Devarajan P. Early prediction of acute renal injury using urinary proteomics. *Am J Nephrol* 2005;25:318-326.
42. Thomas L, Nickolas MS, Matthew J, O'Rourke BS, Jun Yang, Meghan E, Sise BS, Pitro AC, Nicholas Barasch, Charls Buchen, Faris Khan, Kiyoshi Mori, James Giglio, Prasad Devarajan and Jonthan Barasch. Sensitivity and specificity of a Single Emergency Department Measurement of Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin for Diagnosis Acute Kidney Injury. *Ann Inter Med.* 2008;148(11):810-819. Doi:10.7326/0003-4819-148-11-200806030-00003
43. Parikh CR, Devarajan P. New biomarkers of acute kidney injury. *Crit Care Med* 2008;36(4): 159-65.
44. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. NGAL Meta-analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2009;54:1012-24.
45. Haase Fielitz A, Bellomo R, Devarajan P, et al. The predictive performance of plasma neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) increases with grade of acute kidney injury. *Nephrol Dialysis Transplant* 2009;24:(33)49-54.
46. Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Taranta-Janusz K, Michaluk-Skutnik J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of cyclosporine nephrotoxicity? *Pediatr Nephrol.* 2010;25:889-97.
47. Hsu CW, Symons JM. Acute kidney injury: can we improve prognosis? *Pediatr Nephrol.* 2010; 25(12):2401-12.
48. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. NGAL Meta-analysis Investigator Group. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2009;54:1012-24.
49. Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:2534-43.

50. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*. 2005;365(9466):123-128.
51. Krawczeski CD, Woo JG, Wang Y, Bennett MR, Ma Q, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin concentrations predict development of acute kidney injury in neonates and children after cardiopulmonary bypass. *J Pediatr*. 2011; 158(6):1009-1015.
52. Koralkar R, Ambalavanan N, Levitan EB, McGwin G, Goldstein S, Askenazi D. Acute Kidney Injury Reduces Survival in Very Low Birth Weight Infants. *Pediatr Res* 2011;69:354-358
53. Lavery AP, Meinen-Deer JK, Anderson E, Ma Q, Bennett MR, Devarajan P, Schibler KR. Urinary NGAL in premature infants. *Pediatr Res*. 2008;64(4):423-428.
54. Askenazi DZ, Koralkar R, Levitan EB, Goldstein SL, Devarajan P, Khandrika S, Mehta RL, Ambalavanan N. Baseline Values of Candidate Urine Acute Kidney Injury Biomarkers Vary by Gestational Age in Premature Infants. *Pediatr Res*. 2011;70(3):302-306
55. Askenazi D. Are we ready for the clinical use of novel acute kidney injury biomarkers? *Pediatr Nephrol*. 2012;27:1423-1425
56. Holmes CL, Walley KR. Shock. In: Murray PT, Brady HR, Hall JB (eds). *Intensive Care in Nephrology*. Taylor & Francis: New York, NY, 2006; pp 1–18.
57. Mori K, Lee HT, Rapoport D, et al. Endocytic delivery of lipocalin siderophore iron complex rescues the kidney from ischemia reperfusion injury. *J Clin Invest* 2005;115:610e21.
58. American Society of Nephrology Renal Research Report. *J Am Soc Nephrol* 2005;16: 1886e903.
59. Ricci Z, Cruz D, Ronco C. The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: a systematic review. *Kidney Int* 2008;73:538e46.
60. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007;1:R31.
61. Soni SS, Ronco C, Katz N, et al. Early diagnosis of acute kidney injury: the promise of novel biomarkers. *Blood Purif* 2009;28:165e74.
62. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Defining acute renal failure: physiological principles. *Intensive Care Med* 2004;30:33e7.
63. Allgren RL, Marbury TC, Rahman SN, et al. Anaritide in acute tubular necrosis. Auriculon Anaritide Acute Renal Failure Study Group. *N Engl J Med* 1997;336:828e34.

64. Mishra J, Ma Q, Kelly C, et al. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. *Pediatr Nephrol* 2006;21:856e63.
65. de Mendonca A, Vincent JL, Suter PM, et al. Acute renal failure in the ICU: risk factors and outcome evaluated by the SOFA score. *Intensive Care Med* 2000;26:915e21.
66. Tuladhar SM, Puntmann VO, Soni M, et al. Rapid detection of acute kidney injury by plasma and urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin after cardiopulmonary bypass. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;53:261e6.
67. Wheeler DS, Devarajan P, Ma Q, et al. Serum neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) as a marker of acute kidney injury in critically ill children with septic shock. *Crit Care Med* 2008;36:1297e303.
68. Makris K, Markou N, Evodia E, et al. Urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) as an early marker of acute kidney injury in critically ill multiple trauma patients. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:79e82.
69. Siew ED, Ware LB, Gebretsadik T, et al. Urine neutrophil gelatinase associated lipocalin moderately predicts acute kidney injury in critically ill adults. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1823e32.
70. Cruz DN, de Cal M, Garzotto F, et al. Plasma neutrophil gelatinase associated lipocalin is an early biomarker for acute kidney injury in an adult ICU population. *Int Care Med* 2009;36:381e4.
71. Bagshaw SM, Bennett M, Haase M, et al. Plasma and urine neutrophil gelatinase associated lipocalin in septic versus non septic acute kidney injury in critical illness. *Int Care Med*; 2010;36(3):452e61. Dec 3, 2009 [epub ahead of print].
72. Constantin J M, Futier E, Perbet S, et al. Plasma neutrophil gelatinase associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in adult critically ill patients: a prospective study. *J Crit Care*; 2010;25(1):176.e1e6. Sep 24, 2009 [epub ahead of print].
73. Niemann CU, Walia A, Waldman J, et al. Acute kidney injury during liver transplantation as determined by neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Liver Transplant* 2009;15:1852e60.
74. Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med* 2008;148:810e9.
75. Sushrut S. Waikar, Venkata S. Sabbiseti and Joseph V. Bonventre. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int.* 2010; 78(5): 486-494. doi:10.1038/ki.2010.165

76. Devarajan P. Neutrophil gelatinase associated lipocalin: new paths for an old shuttle. *Cancer Ther* 2007;5(B):463e70.
77. Devarajan P. The promise of biomarkers for personalized renal cancer care. *Kidney Int* 2010;77:755e7.
78. KDOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification, 2002.
79. Sarafidis K, Tsepkentzi E, Agakidou E, Diamanti E, Taparkou A, Soubasi V, Papachristou F, Drossou V. Serum and urine acute kidney injury biomarkers in asphyxiated neonates. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(9):1575-82.
80. Pejović B, Erić-Marinković J, Pejović M, Kotur-Stevuljević J, Peco-Antić A. Detection of acute kidney injury in premature asphyxiated neonates by serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (sNGAL)-sensitivity and specificity of a potential new biopmarker. *Biochimica Medica* 2015;25(3):450-9. <http://dx.doi.org/10.11613/BM.2015.046>
81. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J. Biol. Chem.* 1998;273:4135-42.
82. Bailly V, Zhang Z, Meier W, Cate R, Sanicola M, Bonventre JV. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J. Biol. Chem.* 2002;277:39739-48.
83. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006;290:F517-29.
84. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002;62:23-44.
85. Vaidya VS, Ramirez V, Bobadilla NA, Bonventre JV. A microfluidics based assay to measure Kidney injury molecule-1 (KIM-1) in the urine as a biomarker for early diagnosis of acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005;16:192A.
86. Dieterle F, Staedtler F, Grenet O, Cordier A, Perentes E, et al. Qualification of biomarkers for regulatory decision making-a kidney safety biomarker project. *Toxicol. Off. J. Soc. Toxicol.* 2007;96:381
87. Peco-Antić A, Ivanišević I, Vulićević I, Kotur-Stevuljević J, Ilić S, Ivanišević J, Miljković M, Kocev N. Biomarkers of acute kidney injury in pediatric cardiac surgery. *Biochem* 2013;46:1244-1251

88. Artunc FH, Fischer IU, Risler T, et al. Improved estimation of GFR by serum cystatin C in patients undergoing cardiac catheterization. *Int J Cardiol* 2005;102:173-8.
89. Filler G, Bokenkamp A, Hofmann W, et al. Cystatin C as a marker of GFR e history, indications, and future research. *Clin Biochem* 2005;38:1e8.
90. Orlando R, Mussap M, Plebani M, et al. Diagnostic value of plasma cystatin C as a glomerular filtration marker in decompensated liver cirrhosis. *Clin Chem* 2002;48(6 Pt 1):850e8.
91. Herget Rosenthal S, Marggraf G, Husing J, et al. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int* 2004;66:1115e22.
92. Villa P, Jimenez M, Soriano MC, et al. Serum cystatin C concentration as a marker of acute renal dysfunction in critically ill patients. *CritCare* 2005;(1):39-43.
93. Baas MC, Bouman CS, Hoek FJ, et al. Cystatin C in critically ill patients treated with continuous venovenous hemofiltration. *Hemodial Int* 2006 :10(2):33-37.
94. Herrero Morin JD, Malaga S, Fernandez N, et al. Cystatin C and beta2 micro globulin: markers of glomerular filtration in critically ill children. *Crit Care* 2007; 11:R59.
95. Koyner JL, Bennet MR, Worcester EM, et al. Urinary cystatin c as an early biomarker of acute kidney injury following adult cardiothoracic surgery. *Kidney Int* 2008;74(10):59-69.
96. Manetti L, Pardini E, Genovesi M, et al. Thyroid function differently affects serum cystatin C and creatinine concentrations. *J Endocrinol Invest* 2005;28:346e9.
97. Risch L, Herklotz R, Blumberg A, et al. Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin C concentrations in renal transplant patients. *Clin Chem* 2001; 47(20):55-59.
98. Risch L, Huber AR. Glucocorticoids and increased serum cystatin C concentrations. *Clin Chim Acta* 2002;320:133e4. Možda ovu izbrisati da se ne komplikuje više.
98. Knight EL, Verhave JC, Spiegelman D, et al. Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney Int* 2004;65(14):16-21.

99. Yanhong Li, Chenlu Fu, Xiaofei Zhou, Zhiui Xiao, Xueming Zhu, Meifang Jin, Xiaozhong Li, Xing Feng. Urine interleukin-18 and cystatin-C as biomarkers of acute kidney injury in critically ill neonate. *Pediatric Nephrology*. 2012; 10.1007/soo467-011-2072-x
100. Charles L Edelstein, Uwe Christians in *Biomarcers of Kidney Disease*, First edition 2011
101. Yokoyama T, Kamijo Ikemori A, Sugaya T, et al. Urinary excretion of liver type fattyacid binding protein accurately reflects the degree of tubulointerstitial damage. *Am J Pathol* 2009;174:2096e106.
102. Negishi K, Noiri E, Doi K, et al. Monitoring of urinary L type fatty acid binding Protein predicts histological severity of acute kidney injury. *Am J Pathol* 174:1154e9.
103. Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, et al. Renal L type fatty acid binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2894e902.
104. Portilla D, Dent C, Sugaya T, et al. Liver fatty acid binding protein as a biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int* 2008;73:465e72.
105. Nakamura T, Sugaya T, Koide H. Urinary liver type fatty acid binding protein in septic shock: effect of polymyxin B immobilized fiber hemoperfusion. *Shock* 2009;31:454e9
106. Fukagawa M, Nii-Kono T, Kazama JJ. Role of fibroblast FGF23 in helth and cronic kidney disease.*Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14:325-329
107. Jan de Beur SM. Tumor-induced osteomalacia.*JAMA* 2005;294:1260-1267
108. Tenenhouse HS.Regulation of phosphorus homeostasis by the type IIa Na/phosphate cotransporter.*AnnRev Nutr* 2005; 25:197-214
106. Ballard JL, Novak KK, Driver M. A simplified score for assessment of fetal maturation of newly born infants. *J Pediatr* 1979;95:769-74.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476\(79\)80734-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476(79)80734-9)
107. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress: a clinical and electroenceohalographic study. *Arch Neurol* 1976;33:696-705.
<http://dx.doi.org/10.1001/archneur.1976.00500100030012>.
108. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Supplement* 2012;2:1-138.
109. Saeidi B, Koralkar R, Griffin RL, HalloranB, Ambalavanan N, Askenazi DJ, Impact

of gestational age, sex and postnatal age on urine biomarkers in premature neonates. *Pediatr Nephrol* 2015; [Epub ahead of print]. <http://dx.doi.org/101007/s00467-015-3129-z>

110. Raggal NE, Khafagy SM, Mahmoud NH, Beltagy SE. Serum neutrophil gelatinase - associated lipocalin as a marker of acute kidney injury in asphyxiated neonates. *Indian Pediatr.* 2013; 50(%):459-62.

111. Smertka W, Wroblewska J, Suchojad A, Majcherczyk M, Jadamus-Niebroj D. Serum and urinary NGAL in septic newborns. *Biomed Res Int.*2014; 717318.

112. Han WK, Wagener G, Zhu Y, et al. Urinary biomarkers in the early detection of acute kidney injury after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4(8):73-82.

113. Sushrut S. Waikar, Vekata S, Sabbiseti and Joseph V. Bonventre. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int.* 2010;78(5):486-494.

114. Ichimura T, Asselton EJ, Humphreys BD, et al. Kidney injury molecule 1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest* 2008;118(16):57-68.

115. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, et al. Urinary kidney injury molecule 1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290(5):17-29.

116. Han WK, Bailly V, Abichandani R, et al. Kidney Injury Molecule 1 (KIM 1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002;62(2): 37-44.

117. Jetton J.G. Askenazi D.J. Update on acute kidney injury in the neonate. *Current opinion in Pediatrics* 2012;24(2):191-196.

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

AAP- Alanin aminopeptidaza

ABI - akutna bubrežna insuficijencija

ADQI- Acute Dialysis Quality Initiative

AKI- Acute Kidney Injury

AKIN- Acute Kidney Injury Network

AOB- akutno oštećenje bubrega

ATN - akutna tubularna nekroza

AU - arbitrary unit

AUC- Area under curve, površina ispod krive

BD - baze deficit

BPD - bronhopulmonalna displazija

BUN - blood urea nitrogen

CIN- contrast induced nephropathy (kontrastom indukovana nefropatija)

CKD-chronic kidney disease (hronična bubrežna bolest)

CO- srčani output

CPB - cardiopulmonary bypass

CRP - C reaktivni protein

Cys-C - Cystatin-C (cistatin C)

CVVH- kontinuirana veno-venska hemofiltracija

DAM - Decision-Analytic Model

DNK- Deoksiribonukleinska kiselina

ESRD - end-stage renal disease

FABPs - fatty acid binding proteins

FS - fovea sacralis

GFR - glomerular filtration rate

HAVCR-1 - hepatitis A virus cellular receptor-1

HBB - hronična bolest bubrega

HCUP - Healthcare Cost and Utilization Project

HRP - horseradish-peroxidase

HRTE-1 - Renalni tubularni epitelijalni antigen

ICEA - incremental cost-effectiveness analysis

IVH - intraventrikularna hemoragija

UTI - urinary tract infection (infekcija urinarnog trakta)

JGF- jačina glomerulske filtracije

MBP- midium blood pressure (srednji krvni pritisak)

KDIGO - Kidney Disease Improving Global Outcome

KID - Kids' Inpatient Database

KIM-1 - kidney injury molecule-1 (molekul oštećenja bubrega-1)

L-FABP - liver-type fatty acid-binding protein (jetreni tip vezujućeg proteina za masne kiseline)

LMIR5 - leukocyte mono-Ig-like receptor 5

LN - lažno negativni rezultati

LP - lažno pozitivni rezultati

MDRD - Modification of Diet in Renal Disease

MMP-9 - matriks metaloproteinaza-9

MV- mehanička ventilacija

NAG- N-Acetyl- β glukozamidaza

NAPRTCS - North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies

NEC- nekrotični enterokolitis

NGAL - neutrophil gelatinase-associated lipocalin (lipokalin)

NHE3- Urinarni Na^+/H^+ exchanger isoform 3

NIDDK- Nacionalni Institut za Dijabetes, Digestivne i Bubrežne bolesti USA

ONIN- Odeljenje neonatalne intenzivne nege

ORDP- Oxygen radical diseases of prematurity

OSD- Okultni sakralni disrafizam

POC - point-of-care

pRIFLE - pediatric RIFLE

QALY - Quality adjusted life-year

RACHS - Risk Adjustment for Congenital Heart Surgery

RIFLE - Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage Kidney Disease

ROC - Receiver operating characteristic curve

ROP - Retinopatija prematuriteta

ROS - Reactive oxygen species, reaktivne kiseonične vrste

RRT - Renal Replacement Therapy

sCys C - Cys C u serumu

sNGAL - NGAL u serumu

TAS - totalni antioksidativni status

Tc 99m DMSK - Tehnecijum 99m dimerkaptosukcinilna kiselina

TOS - totalni oksidativni status

TIM-1 - T-cell immunoglobulin mucin-1

TMB - tetrametilbenzidin

TNF- α - tumor necrosis factor alpha

UTI- urinary tract infection

VEGF-vaskularni endotelijalni faktor rasta

BIOGRAFIJA

Dr Biljana Pejović rođena je 31. Maja 1956. godine u Višegradu. Medicinski fakultet u Beogradu je upisala 1975. a diplomirala 1981. Obavezan lekarski staž je 1982. obavila u Kliničko-bolničkom centru Zvezdara Specijalizaciju iz pedijatrije završila je 1996. Godine u Univerzitetској Dečјој klinici u Beogradu sa odličnim uspehom.

Nakon položenog stručnog ispita zasniva prvi radni odnos u Domu zdravlja Zemun u službi pedijatrije gde ostaje sve do 1996. godine. Po završenoј specijalizaciji prelazi da radi u Ginekološko-akušersku kliniku Narodni front, Beograd, odeljenje neonatologije.

Od 2001. godine zaposlena je u Institutu za neonatologiju u Beogradu, u Odeljenju intenzivne nege. Od januara 2015. godine vraća se ponovo u GAK Narodni Front, gde radi i danas. Užu specijalizaciju iz neonatologije završila je 2000. Godine, odbranivši rad pod nazivom „Neoligurijska i oligurijska akutna bubrežna insuficijencija u hipoksičnog novorođenčeta“ pod mentorstvom Prof. Dr Amire Peco-Antić. Poslediplomske magistarske studije iz neonatologije završila je 2004. godine, kada je odbranila magistarski rad pod nazivom “Uporedno ispitivanje krvnog pritiska kod novorođenčadi različite gestacije i uzrasta“, mentor Prof. Dr Amira Peco-Antić.

Uže oblasti interesovanja i istraživanja su joj: pedijatrija, neonatologija, perinatologija, nefrologija, ultrasonografija abdomena. U poslednjih nekoliko godina učestvovala je na brojnim seminarima, simpozijumima i kongresima, gde je izložila dvadeset autorskih i više koautorskih radova. Najznačajnije od ovih edukacija su: 12th IPNA: International Pediatric Nephrology Assotiation Seattle USA, septembar 1-5., 2001.godine, i 13th IPNA: International Pediatric Nephrology Assotiation, Adelaide, Australia, septembar 1-5., 2004. godine. Član je SLD od 1985. godine. Posebno se ističe u radu pedijatrijske sekcije SLD i svojim zalaganjem doprinosi poboljšanju kvaliteta njenog rada. Od 2006. godine član je Predsedništva pedijatrijske sekcije SLD. Aktivno učestvuje u stručnim sastancima i kongresima pedijatarata i perinatologa, kao i sastancima Nefrološke sekcije SLD. Od 2006. do 2015. godine bila je jedan je od urednika časopisa Klinički seminari Instituta za neonatologiju, koji su na Medicinskom fakultetu u Beogradu uvršteni u kontinuiranu medicinsku edukaciju.

Dr Biljana Pejović se odlikuje visokim moralnim kvalitetima, zbog čega je vrlo cenjena među kolegama. Na osnovu njene aktivnosti, stalnog stručnog usavršavanja, Komisija pedijatrijske sekcije joj je dodelila zvanje Primarijus 19.03.2008. godine.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana mr sci dr Biljana Pejović

broj upisa _____

Izjavljujem

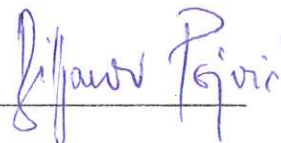
da je doktorska disertacija pod naslovom

RANO OTKRIVANJE AKUTNOG OŠTEĆENJA BUBREGA KOD PRETERMINSKOG
NOVOROĐENČETA POMUĆU URINARNIH BIOMARKERA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19.07 2016 g.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Biljana Pejović

Ime i prezime autora _____

Broj upisa _____

Studijski program : Pedijatrija/Neonatologija

Naslov rada: RANO OTKRIVANJE AKUTNOG OŠTEĆENJA BUBREGA KOD
PRETERMINSKOG NOVOROĐENČETA POMOĆU URINARNIH BIOMARKERA

Mentor: Prof.dr. Amira Peco-Antić

Potpisani _____



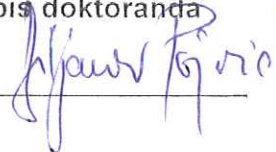
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 19.07 2016. g.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

RANO OTKRIVANJE AKUTNOG OŠTEĆENJA BUBREGA KOD PRETERMINSKOG NOVOROĐENČETA POMOĆU URINARNIH BIOMARKERA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu, 19.07 2016g.

Potpis doktoranda

