

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

*Stanislava M. Petrović*

**DIJAGNOSTIČKI I EKONOMSKI  
ZNAČAJ ODREĐIVANJA BIOMARKERA  
AKUTNOG OŠTEĆENJA BUBREGA  
KOD DECE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

*Stanislava M. Petrović*

**DIAGNOSTIC AND ECONOMIC IMPACT  
OF ACUTE KIDNEY INJURY  
BIOMARKERS DETERMINATION IN  
PEDIATRIC POPULATION**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2015.

***Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:***

---

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

---

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

---

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

***Datum odbrane:*** \_\_\_\_\_

## IZRAZI ZAHVALNOSTI

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za medicinsku biohemiju, Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta u saradnji sa odeljenjem nefrologije Univerzitetske dečije klinike u Beogradu, u okviru projekata čiji su rukovodioci prof. dr Zorana Jelić-Ivanović i prof. dr Amira Peco-Antić.

Zahvaljujem se mentorki prof. dr Nataši Bogavac-Stanojević na ukazanom poverenju i podršci tokom osmišljavanja i izrade ove disertacije, prenetom znanju i svim dobronamernim savetima koje mi je uputila.

Prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević se zahvaljujem za zalaganje i podršku u svim fazama rada, a posebno na savetima za analizu parametara oksidativnog statusa.

Prof. dr Amiri Peco-Antić se zahvaljujem na angažovanju oko kreiranju projekta, podršci tokom prikupljanja biološkog materijala, korisnim savetima i sugestijama vezanim za kliničke podatke koji su deo studije.

Zahvaljujem se doc. dr Dragani Lakić sa Katedre za socijalnu farmaciju i farmaceutsko zakonodavstvo Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta na sugestijama u toku pisanja dela doktorske disertacije vezane za procenu troškova i efektivnosti laboratorijskih testova.

Zahvaljujem se dipl. ph Milici Miljković i dr Ivani Ivanišević na pomoći tokom sakupljanja uzoraka. Konstruktivni stručni razgovori sa Milicom i Ivanom su mi pružali podršku da smognem snage kad je bilo najteže.

Svim zaposlenim na Katedri za medicinsku biohemiju Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta zahvaljujem se na podršci i pomoći u toku izrade doktorske disertacije.

*Posebnu zahvalnost dugujem porodici na podršci, razumevanju i ljubavi što mi je dalo snage da ovaj rad započnem i završim. Doktorsku disertaciju posvećujem roditeljima, Momčilu i Jelici Petrović.*

# DIJAGNOSTIČKI I EKONOMSKI ZNAČAJ ODREĐIVANJA BIOMARKERA AKUTNOG OŠTEĆENJA BUBREGA KOD DECE

## REZIME

Akutno oštećenje bubrega (AOB) se odlikuje naglim pogoršanjem bubrežne funkcije u periodu od nekoliko sati ili dana, usled čega bubrezi nisu sposobni da efikasno izlučuju azotne produkte metabolizma i održavaju homeostazu tečnosti i elektrolita u organizmu. Razvoj AOB tokom boravka pacijenata na intenzivnoj nezi je povezan sa devet puta većom stopom smrtnosti i četiri puta dužim boravkom u bolnici. Pored toga, postoje brojni dokazi da je rizik od hroničnih komplikacija značajno uvećan kod pacijenata sa AOB. Blagovremeno identifikovanje dece sa AOB može biti od ključnog značaja za dalje zbrinjavanje, pogotovu što trenutni laboratorijski i klinički parametri nisu dovoljno pouzdani za detekciju akutnog oštećenja. Koncentracija kreatinina u serumu, koja je trenutno glavni dijagnostički test, uvećava se kasno u AOB. Zato su aktuelna ispitivanja biomarkera koji odražavaju promenu bubrežne funkcije u akutnim stanjima, uključujući cistatin C [*Cystatin-C* (Cys-C)], lipokalin [*neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL)], molekul oštećenja bubrega-1 [*kidney injury molecule-1* (KIM-1)], jetreni tip vezujućeg proteina za masne kiseline [*liver-type fatty acid-binding protein* (L-FABP)].

Mogući uzrok za razvoj AOB je i teži oblik infekcije urinarnog trakta (IUT). Aktuelna dijagnostička procedura za praćenje zahvaćenosti bubrega tokom IUT je scintigrafija bubrega, koja je invazivna i skupa dijagnostička tehnika. Pored toga, danas je dobro poznato da oksidativni stres ima važnu ulogu u patogenezi bolesti bubrega. Pošto je efekat različitih oksidanasa i antioksidanasa u serumu aditivan, primenom Erel-ovih metoda može se odrediti ukupan kapacitet svih pojedinačnih oksidanasa i antioksidanasa u organizmu koji se označavaju kao totalni oksidativni status (TOS) i totalni antioksidativni status (TAS).

Sa ekonomske tačke gledišta, AOB je povezano sa većim utroškom finansijskih sredstava usled dužeg boravka ovih pacijenata u bolnici, ali i većih troškova povezanih

sa dugoročnim posledicama. AOB je česta komplikacija i tokom kardiohirurških intervencija u pedijatriji.

Cilj ove studije bio je ispitivanje promena biomarkera bubrežne funkcije: KIM-1, NGAL u urinu (uNGAL) i NGAL u serumu (sNGAL) u odnosu na stanje infekcije i razvoj AOB, kao i utvrđivanje dijagnostičke tačnosti ovih parametara u skriningu razvoja AOB i dužine trajanja inflamacije kod dece sa IUT. Takođe je ispitivan i ukupan prooksidantni i antioksidativni kapacitet dece sa IUT merenjem parametara: TOS, TAS, indeksa oksidativnog stresa (OSI), kao i njihove promene u skladu sa stanjem akutne inflamacije i razvojem AOB. Urađena je ekonomska procena efektivnosti primene različitih AOB biomarkera: uNGAL, L-FABP u urinu (uL-FABP) i Cys-C u serumu (sCys-C) u odnosu na aktuelnu dijagnostičku metodu (merenje koncentracije kreatinina u serumu) kod dece u kardiohirurgiji.

Ispitivanje biomarkera bubrežne funkcije KIM-1, uNGAL, sNGAL i parametara oksidativnog statusa TOS, TAS, OSI je obuhvatilo 50 pacijenata prosečne starosti oko dve godine kojima je na prijemu u bolnicu Univerzitetske dečije klinike u Beogradu dijagnostikovana prva febrilna IUT. U ekonomskoj analizi primene biomarkera AOB kod dece u kardiohirurgiji primenjena je inkrementalna analiza odnosa troškova i efektivnosti (TE). Kao pokazatelj efektivnosti primenjen je parametar godine života prilagođene u odnosu na kvalitet [*Quality adjusted life-year (QALY)*].

Ispitivanjem biomarkera bubrežne funkcije kod dece sa IUT utvrđeno je da su koncentracije uNGAL kod ispitanika sa dužim trajanjem inflamacije bile više (115,37 ng/mL) u odnosu na uNGAL koncentracije ispitanika sa kraćim trajanjem inflamacije u isto vreme (67,87 ng/mL,  $P=0,022$ ). Od parametara oksidativnog statusa, TAS vrednosti su bile značajno više kod pacijenata sa dužim trajanjem inflamacije ( $0,99 \text{ mmol/L} \pm 0,40 \text{ mmol/L}$ ) u odnosu na one kod kojih je inflamacija kraće trajala ( $0,57 \text{ mmol/L} \pm 0,37 \text{ mmol/L}$ ),  $P=0,017$ . Shodno tome, OSI vrednosti su bile značajno niže u grupi sa dužim trajanja inflamacije [0,032 AU (0,018-0,042)] nego u grupi sa kraćim trajanjem inflamacije [0,041 AU (0,029-0,053)],  $P=0,037$ . Iako su značajne razlike u bazalnim vrednostima između grupa sa i bez AOB utvrđene jedino za KIM-1 (0,519 vs. 0,287 ng/mL,  $P=0,038$ ), tokom prijema pacijenata u bolnicu KIM-1 nije pokazao sposobnost razdvajanja pacijenata sa AOB i bez AOB ( $AUC=0,620$ ,  $P=0,175$ ).

Rezultati ekonomske analize su prikazani kao inkrementalni odnos TE [*incremental cost-effectiveness ratio* (ICER)]. Analizirane dijagnostičke strategije primene biomarkera za AOB su bile isplative u odnosu na aktuelnu dijagnostičku metodu. Međutim, strategije bazirane na primeni uNGAL i sCysC su imale veće troškove i nižu efikasnost (dominirane) u odnosu na uL-FABP strategiju. ICER za uL-FABP u poređenju sa serumskim kreatininom je 5959,35\$ po jednom dodatnom QALY.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da iako se uNGAL može primeniti kao osetljiv marker za rano otkrivanje IUT u odsustvu AOB, bazalne vrednosti uNGAL se ne mogu koristiti za procenu dužeg trajanja inflamacije u cilju prognoze ishoda bolesti kod dece sa IUT. KIM-1 je manje osetljiv na stanje inflamacije od NGAL i samim tim više specifičan za ishemijsko oštećenje bubrega. Međutim, dijagnostička tačnost KIM-1 u detekciji razvoja AOB kod dece sa IUT nije zadovoljavajuća za kliničku primenu. Parametri TAS i OSI kao markeri oksidativnog stresa tokom IUT su se menjali u zavisnosti od trajanja inflamacije. Međutim, nijedan od ispitivanih parametara oksidativnog stresa nije ispoljio osetljivost na akutne promene u funkciji bubrega.

Rezultati ekonomske studije sugerišu da bi upotreba uL-FABP predstavljala troškovno efikasnu strategiju za rano otkrivanje AOB kod dece tokom kardiohirurških intervencija.

**Ključne reči:** akutno oštećenje bubrega, infekcije urinarnog trakta, kardiohirurgija, deca, biomarkeri, oksidativni stres, analiza odnosa troškova i efektivnosti

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Medicinska biohemija

**UDK broj:** 616-079:616.61-008.6:546.21(043.3)  
657.471.12(043.3)

# **DIAGNOSTIC AND ECONOMIC IMPACT OF ACUTE KIDNEY INJURY BIOMARKERS DETERMINATION IN PEDIATRIC POPULATION**

## **ABSTRACT**

Acute kidney injury (AKI) is characterized by a reversible increase in the blood concentration of creatinine and nitrogenous waste products and by the inability of the kidney to regulate fluid and electrolyte homeostasis appropriately. The development of AKI during the stay of patients in intensive care is associated with nine times higher the mortality rate and four times longer hospital stay. Retrospective studies also suggest that the presence of AKI after cardiac surgery may be associated with the development of chronic kidney disease (CKD). Timely identification of children with AKI may be critical to management, though current laboratory and clinical markers may be unreliable for acute injury. Increase in serum creatinine (sCr) concentration is used for the diagnosis of AKI. Unfortunately, increase in sCr concentration may be delayed compared to the already existing renal impairment and therefore administered therapy may be less effective. The search is on for real-time markers of AKI, which would allow for rapid and reliable diagnosis, including cystatin-C (Cys-C), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule-1 (KIM-1), liver-type fatty acid-binding protein (L-FABP).

Possible cause for the development of AKI is a severe form of urinary tract infection (UTI). Scintigraphy is a current diagnostic procedure for monitoring of renal involvement during UTI (upper UTI). In addition, nowadays it is a well-known fact that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of various kidney diseases. Since the effect of various oxidants and antioxidants in serum are additive, the total capacity of all the individual oxidants and antioxidants in the body can be determined by Erel's methods, which are referred as total oxidative status (TOS) and the total antioxidant status (TAS).

From an economic standpoint, AKI is associated with higher resource use, as measured by longer intensive care unit and hospital lengths of stay, in addition to higher



costs associated with its long-term effects. AKI is significant problem in children with congenital heart disease (CHD) who undergo cardiac surgery.

The aim of this study was to examine the changes of biomarkers of renal function: KIM-1, NGAL in urine (uNGAL), and NGAL in serum (sNGAL) compared to the infection and the development of AKI, as well as determining the diagnostic accuracy of these parameters in the screening of AKI development and duration of inflammation in children with UTI. Also, this study examined the total prooxidant and antioxidant capacity of children with UTI measuring parameters: TOS, TAS, oxidative stress index (OSI), as well as their changes in accordance with a state of acute inflammation and the development of AKI. The aim of economic study was to perform the cost-effectiveness analysis of using uNGAL, serum cystatin C (sCysC), and urine liver fatty acid-binding protein (uL-FABP) for the diagnosis of AKI in children after cardiac surgery compared with current diagnostic method (monitoring of sCr level).

Investigation of biomarkers of kidney function KIM-1, uNGAL, sNGAL and oxidative status parameters TOS, TAS, OSI included 50 patients with an average age about two years, whom diagnosed first febrile UTI at the admission of the University Children Hospital in Belgrade. In economic evaluation of application of AKI biomarkers in children after cardiac surgery incremental cost-effectiveness analysis (ICEA) was applied. The utility measurement included in the analysis was quality-adjusted life years (QALY).

Investigation of AKI biomarkers in children with UTI has shown that uNGAL levels in subjects with longer duration of inflammation were higher (115.37 ng/mL) than uNGAL levels in subjects with shorter duration of inflammation (67.87 ng/mL,  $P=0.022$ ). Difference in sNGAL and KIM-1 levels were not significant ( $P=0.155$  and  $P=0.198$ , respectively). Significant difference was seen in KIM-1 excretion among groups with and without AKI ( $P=0.038$ ). KIM-1 was not able to discriminate between subjects with and without AKI (area under the curves (AUC)=0.620,  $P=0.175$ ). According to duration of inflammation during UTI, TAS values were significantly higher (0.99 v.s. 0.58 mmol/L,  $P=0.017$ ) and OSI values were significantly lower (0.032 v.s. 0.041 AU,  $P=0.037$ ) in the subjects with longer duration of inflammation than in the subjects with shorter duration of inflammation. Basal values of oxidative status parameters did not show significant difference according to AKI development.

The results of the economic analysis are presented as the incremental cost-effectiveness ratio (ICER). Analysed biomarker-based diagnostic strategies for AKI were cost-effective compared to current diagnostic method. However, uNGAL and sCys C strategies yielded higher costs and lower effectiveness compared to uL-FABP strategy. Therefore, ICER for uL-FABP compared to sCr was \$5959.35/QALY.

Results of this study show that although uNGAL can be used as a sensitive marker for early detection of UTI in the absence of AKI, baseline uNGAL can not be used to estimate duration of inflammation in order prediction of disease outcome in children with UTI. KIM-1 is less sensitive to the state of inflammation than NGAL and thus more specific for ischemic kidney injury. However, accuracy of KIM-1 in screening of AKI development in children with UTI is low. TAS and OSI as markers of oxidative stress during UTI are sensitive to accompanying inflammatory condition.

Results of economic evaluation of AKI biomarkers in children after cardiac surgery, suggest that the use of uL-FABP would represent cost-effective strategy for early diagnosis of AKI in children after cardiac surgery.

**Key words:** acute kidney injury, urinary tract infection, cardiac surgery, children, biomarkers, oxidative stress, cost effectiveness analysis

**Scientific field:** Pharmacy

**Special topic:** Medical biochemistry

**UDC number:** 616-079:616.61-008.6:546.21(043.3)  
657.471.12(043.3)

## LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

**ABTS** – [2,2-azobis (3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat)]

**AC** - aorta clamp

**AKIN** - Acute Kidney Injury Network

**AOB** - akutno oštećenje bubrega

**ATN** – akutna tubularna nekroza

**AU** - arbitrary unit

**BUN** - blood urea nitrogen

**CEA** - cost-effectiveness analysis

**CPB** - cardiopulmonary bypass

**CRP** - C reaktivni protein

**Cys-C** - Cystatin-C (cistatin C)

**DAM** - Decision-Analytic Model

**ESRD** - end-stage renal disease

**FABPs** - fatty acid binding proteins

**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

**IUT**– infekcija urinarnog trakta

**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

**NAPRTCS** - North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies

**NGAL** - neutrophil gelatinase-associated lipocalin (lipokalin)

**OSI**– indeks oksidativnog stresa

**PN** - pravi negativni rezultati

**POC** - point-of-care

**PP** - pravi pozitivni rezultati

**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

**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

**TE** - analiza odnosa troškova i efektivnosti

**TFEC** - S-(1,1,2,2-tetrafluoroetil)-L-cistein

**TIM-1** - T-cell immunoglobulin mucin-1

**TMB** – tetrametilbenzidin

**TNF- $\alpha$**  - tumor necrosis factor alpha

**TOS**– totalni oksidativni status

**uL-FABP** - L-FABP u urinu

**uNGAL** - NGAL u urinu

## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Akutno oštećenje bubrega.....	2
1.1.1. Definicija i klasifikacija AOB.....	2
1.1.2. Incidenca i etiologija AOB.....	5
1.1.2.1. Infekcije urinarnog trakta kao uzrok AOB kod dece.....	7
1.1.2.2. Kardiohirurške intervencije kao uzrok AOB kod dece .....	8
1.1.3. Serumski kreatinin kao marker AOB .....	9
1.1.4. Kriterijumi za uključivanje novih biomarkera AOB u kliničku praksu .....	11
1.1.4.1. Uzorci za određivanje biomarkera AOB .....	13
1.1.4.2. Određivanje efektivnosti biomarkera AOB.....	14
1.1.4.3. Troškovna isplativost biomarkera AOB .....	16
1.1.5. Biomarkeri AOB - rani pokazatelji oštećenja bubrega .....	16
1.1.5.1. Cistatin C .....	17
1.1.5.2. Lipokalin.....	21
1.1.5.3. Molekul oštećenja bubrega-1 .....	24
1.1.5.4. Jetreni tip vezujućeg proteina za masne kiseline.....	28
1.1.6. Oksidativni stres i AOB kod dece sa IUT .....	30
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	35
3. MATERIJAL I METODE .....	37
3.1. Biomarkeri AOB i parametri oksidativnog statusa kod dece sa IUT.....	37
3.1.1. Dizajn studije i ispitanici.....	37
3.1.2. Uzorkovanje krvi i urina .....	38
3.1.3. Metode određivanja biohemijskih parametara .....	39
3.1.3.1. Određivanje biomarkera AOB – ELISA metoda.....	39
3.1.3.1.a Princip ELISA metode .....	39
3.1.3.1.b Materijal potreban za izvođenje ELISA metode.....	40
3.1.3.1.c Postupak izvođenja ELISA metode .....	41
3.1.3.2. Određivanje parametara oksidativnog statusa .....	42
3.1.3.2.a Princip metode za određivanje TOS u serumu.....	42
3.1.3.2.b Princip metode za određivanje TAS u serumu .....	43

3.1.3.3. Računska operacija za određivanje OSI .....	44
3.1.4. Statistička analiza .....	45
3.2. Ekonomska analiza primene biomarkera AOB kod dece u kardiohirurgiji .....	46
3.2.1. Analiza odnosa troškova i efektivnosti .....	46
3.2.1.1. "Drvo odluke" i Markovljev model .....	48
3.2.1.2. Godine života prilagođene u odnosu na kvalitet .....	48
3.2.2. Model .....	49
3.2.2.1. Tranzicione verovatnoće za zdravstvena stanja .....	51
3.2.2.2. Efektivnost biomarkera AOB .....	52
3.2.2.3. Merenje kvaliteta života .....	53
3.2.3. Troškovi .....	53
3.2.4. Analiza osetljivosti .....	54
4. REZULTATI .....	55
4.1. Biomarkeri AOB i parametri oksidativnog statusa kod dece sa IUT .....	55
4.1.1. Demografske i biohemijske karakteristike ispitivane populacije .....	55
4.1.2. Inter- i intra-individualna varijabilnost biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa .....	57
4.1.3. Promene vrednosti biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa u vreme prijema i u vreme otpusta iz bolnice .....	61
4.1.4. Promene vrednosti biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa u odnosu na trajanje inflamacije .....	62
4.1.5. Dijagnostička tačnost biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa za detekciju dužeg trajanja inflamacije .....	64
4.1.5.1. Dijagnostička tačnost biomarkera AOB za detekciju dužeg trajanja inflamacije .....	64
4.1.5.2. Dijagnostička tačnost parametara oksidativnog statusa za detekciju dužeg trajanja inflamacije .....	65
4.1.6. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa za detekciju dužeg trajanja inflamacije u kombinaciji sa brojem leukocita .....	66
4.1.6.1. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti biomarkera AOB za detekciju dužeg trajanja inflamacije u kombinaciji sa brojem leukocita .....	66
4.1.6.2. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti parametara oksidativnog statusa za detekciju dužeg trajanja inflamacije u kombinaciji sa brojem leukocita .....	68

4.1.7. Promene vrednosti biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa u odnosu na razvoj AOB .....	69
4.1.8. Dijagnostička tačnost biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa za detekciju AOB.....	72
4.1.8.1. Dijagnostička tačnost biomarkera AOB za detekciju AOB .....	72
4.1.8.2. Dijagnostička tačnost parametara oksidativnog statusa za detekciju AOB..	72
4.1.9. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa za detekciju AOB u kombinaciji sa urejom.....	73
4.1.9.1. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti biomarkera AOB za detekciju AOB u kombinaciji sa urejom .....	73
4.1.9.2. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti parametara oksidativnog statusa za detekciju AOB u kombinaciji sa urejom .....	75
4.1.10. Promena biomarkera AOB u zavisnosti od prisustva AOB i vremena provedenog u bolnici .....	76
4.2. Ekonomska analiza primene biomarkera AOB kod dece u kardiohirurgiji.....	77
4.2.1. Varijable korišćene u osnovnom modelu .....	77
4.2.2. Troškovi .....	78
4.2.3. Analiza odnosa troškova i efektivnosti .....	79
4.2.4. Analiza osetljivosti .....	82
5. DISKUSIJA .....	84
5.1. Biomarkeri AOB i parametri oksidativnog statusa kod dece sa IUT.....	84
5.2. Ekonomska analiza primene biomarkera AOB kod dece u kardiohirurgiji.....	90
6. ZAKLJUČAK.....	96
7. LITERATURA: .....	97
BIOGRAFIJA .....	111
PRILOZI (IZJAVE).....	114

## **1. UVOD**

Bubrezi imaju centralnu ulogu u homeostatskim mehanizmima organizma i stoga je poremećaj funkcije bubrega povezan sa uvećanom stopom morbiditeta i mortaliteta (1). Oboljenja bubrega mogu uzrokovati različiti poremećaji kao što su infekcije, trovanja, ishemija, hipertenzija, genetska i metabolička oboljenja, autoimuni poremećaji. Kao rezultat ovih različitih poremećaja može doći do razvoja akutnog oštećenja bubrega (AOB) koje se definiše kao naglo smanjenje bubrežne funkcije i izlučivanje urina (2), ili hronične bolesti bubrega (HBB) u kojoj izmenjena struktura i funkcija bubrega postoje najmanje tri meseca (3). HBB predstavlja veliki zdravstveni problem širom sveta, čija se incidenca i prevalenca permanentno uvećavaju, a karakteriše ih težak ishod bolesti i visoki troškovi lečenja. Bolesti bubrega se mogu ispoljiti pojavom karakterističnih simptoma, ali su češće asimptomatske. Zbog češće asimptomatske prirode HBB se obično detektuje u odmakloj fazi, usled čega se smanjuje mogućnost uticaja na tok i ishod bolesti. Sa druge strane, AOB karakteriše visoka stopa mortaliteta uprkos permanentnom unapređenju tretmana ovog tipa bolesti. Progresija akutne bubrežne bolesti u hroničnu, i hronične u bubrežnu insuficijenciju može se prevenirati ili pak odložiti ranom dijagnostikom bolesti i blagovremenim tretmanom (4, 5). Uprkos ohrabrujućim rezultatima u tretmanu AOB koje pokazuju studije sprovedene na životinjama (6), nijedan tretman nije dokazan kao potpuno uspešan kod ljudi. Jedan od bitnih razloga koji doprinosi ovom problemu jeste nedostatak biomarkera za ranu dijagnostiku AOB. Tradicionalni laboratorijski pristup za detekciju bubrežnih bolesti obuhvata određivanje koncentracije kreatinina, ureje, azota u krvi [*blood urea nitrogen* (BUN)], elektrolita u serumu i urinu, klirensa kreatinina, kao i hemijski i mikroskopski pregled urina (1). Koncentracija kreatinina u serumu, koja je trenutno glavni dijagnostički test, uvećava se kasno u AOB i marker je sa ograničenom tačnošću u slučaju akutne promene brzine glomerularne filtracije [*glomerular filtration rate* (GFR)] (7). Pored toga, iako je biopsija bubrega još uvek zlatni standard za postavljenje dijagnoze AOB i HBB (8), radi se o invazivnoj proceduri koja obično zahteva hospitalizaciju. Takođe, iako je biopsija



korisna za postavljanje dijagnoze, ona ne daje uvek smernice u pogledu lečenja i prognoze bolesti.

## 1.1. Akutno oštećenje bubrega

### 1.1.1. Definicija i klasifikacija AOB

Termin AOB je nedavno uveden kao zamena za termin akutna bubrežna insuficijencija. Predložen je sa ciljem da se bolje sagleda raznovrstan spektar molekularnih i biohemijskih procesa koji karakterišu AOB sindrom (9). Nedostatak preporučene, precizne definicije AOB predstavljao je veliki problem za utvrđivanje incidence AOB po istom kriterijumu, kao i za poređenje rezultata različitih studija. Radna grupa koja je zadužena za kontrolu kvaliteta primene dijalize u akutnim stanjima utvrdila je preko 30 definicija za AOB koje su korišćene u stručnoj literaturi. Definicije za AOB su varirale od stanja u kojima je bazalna vrednost serumskog kreatinina povećana za 25%, do stanja u kojima je primena dijalize neophodna (9). Prema opštoj definiciji, AOB se odlikuje naglim pogoršanjem bubrežne funkcije u periodu od nekoliko sati ili dana, usled čega bubrezi nisu sposobni da efikasno izlučuju azotne produkte metabolizma i održavaju homeostazu tečnosti i elektrolita u organizmu (10). Kako bi se izbegla varijabilnost definicija u kliničkoj praksi, međunarodni paneli usvojeni konsenzusom su standardizovali definiciju AOB, najpre 2002. godine uvođenjem *Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage Kidney Disease* (RIFLE) sistema klasifikacije (11), koji je modifikovan 2007. godine definisanjem *Acute Kidney Injury Network* (AKIN) sistema klasifikacije (12).

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*), kao i dva ishoda: gubitak bubrežne funkcije (L - *loss of function*) i završni stadijum bolesti bubrega (E - *end-stage renal disease*), (tabela 1). Klasifikacione kriterijume za AOB u RIFLE sistemu klasifikacije čine: koncentracija kreatinina u serumu, GFR i izlučivanje urina.

**Tabela 1.** RIFLE sistem klasifikacije za AOB

Kriterijum		
RIFLE kategorija	Koncentracija kreatinina i GFR	Izlučivanje urina
<i>Stepen jačine</i>		
Risk Rizik	↑ Kreatinin $\geq 1,5x$ ili ↓ GFR $\geq 25\%$	<0,5 mL/kg/h tokom 6h
Injury Oštećenje	↑ Kreatinin $\geq 2x$ ili ↓ GFR $\geq 50\%$	<0,5 mL/kg/h tokom 12h
Failure Slabost	↑ Kreatinin $\geq 3x$ ili [Kreatinin] >350 $\mu\text{mol/L}$ ili ↓ GFR $\geq 75\%$	<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	-

*Tabela modifikovana prema referenci broj 15*

AKIN sistem klasifikacije definiše AOB u odnosu na apsolutno i procentualno povećanje serumskog kreatinina ili izlučivanje urina, (tabela 2). Ovaj sistem klasifikacije unosi proširenje vremenskog perioda za postavljenje AOB dijagnoze, kao i upotrebu termina "insuficijencija" za pacijente kod kojih je neophodno primeniti terapiju zamene bubrežne funkcije [*renal replacement therapy* (RRT)], bez obzira na vrednosti kreatinina ili oliguriju. Prema AKIN kriterijumu, AOB se definiše kao naglo smanjenje bubrežne funkcije (u toku 48h) mereno apsolutnim povećanjem koncentracije kreatinina u serumu za 0,3 mg/dL (26,5  $\mu\text{mol/L}$ ), 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.** AKIN sistem klasifikacije za AOB

Kriterijum		
AKIN kategorija	Koncentracija kreatinina	Izlučivanje urina
<i>Stepen jačine</i>		
<b>1</b>	$\geq 0,3$ mg/dL (26,5 $\mu$ mol/L) ili $\uparrow$ 150-200% (1,5-1,99x)	<0,5 mL/kg/h tokom 6h
<b>2</b>	$\uparrow$ 200-300% (2,0-2,99x)	<0,5 mL/kg/h tokom 12h
<b>3</b>	$\uparrow$ 300% ( $\geq 3x$ ) ili >354 $\mu$ mol/L sa akutnom epizodom >44 $\mu$ mol/L	<0,3 mL/kg/h tokom 24h ili anurija tokom 12h

*Tabela modifikovana prema referenci broj 15*

RIFLE sistem klasifikacije je kasnije modifikovan za potrebe pedijatrijske populacije (*pediatric RIFLE* (pRIFLE)) (13) (tabela 3), gde je kao kriterijum za postavljenje dijagnoze AOB primenjen klirens kreatinina koji se izračunava primenom Schwartz-ove formule (14).

**Tabela 3:** Modifikacija RIFLE sistema klasifikacije za AOB u pedijatriji (pRIFLE)

<b>Kriterijum</b>		
<b>pRIFLE kategorija</b>	<b>Procenjen klirens kreatinina</b>	<b>Izlučivanje urina</b>
<i>Stepen jačine</i>		
<b>Risk Rizik</b>	↓ ≥25%	<0,5 mL/kg/h tokom 8h
<b>Injury Oštećenje</b>	↓ ≥50%	<0,5 mL/kg/h tokom 16h
<b>Failure Slabost</b>	↓ ≥75% ili <35 mL/min/1,73m <sup>2</sup>	<0,3 mL/kg/h tokom 24h ili anurija tokom 12h
<i>Ishod</i>		
<b>Loss of function Gubitak bubrežne funkcije</b>	Perzistentan gubitak bubrežne funkcije >4 nedelje	-
<b>End-stage renal disease Završni stadijum bolesti burega</b>	Perzistentan gubitak bubrežne funkcije >3 meseca	-

*Tabela modifikovana prema referenci broj 15*

Međutim, iako su nedavno uvedeni sistemi klasifikacije AOB, pRIFLE i AKIN korisni za retrospektivna ispitivanja i epidemiološke studije, oni imaju ograničenu upotrebu za lekare u proceni stanja dece u svakodnevnoj kliničkoj praksi (15). Izlučivanje urina je pod uticajem statusa ukupnog volumena tečnosti u organizmu, koncentracije antidiuretskog hormona, prisustva opstrukcije ili upotrebe diuretika, pri čemu se tačna zapremina urina može odrediti samo upotrebom katetera. Takođe, pri praćenju relativnog povećanja serumske koncentracije kreatinina, problem predstavlja što su bazalne vrednosti često nedostupne za izračunavanje.

### 1.1.2. Incidenca i etiologija AOB

Heterogena etiologija i kompleksnost patofizioloških mehanizama koji su uključeni u razvoj AOB značajno otežava utvrđivanje prave incidence AOB. Incidenca AOB varira od 5% hospitalizovanih pacijenata do 30-50% pacijenata na intenzivnoj nezi, a brojni

podaci ukazuju da incidenca raste alarmantnom brzinom (16). Prema podacima pedijatrijskih službi incidenca AOB je uvećana preko devet puta od 1980. do 2004. godine, zbog sve veće upotrebe invazivnih procedura i većeg broja kritično obolele dece (17). 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 roku od 7 dana (13). Razvoj AOB tokom boravka pacijenata na intenzivnoj nezi je povezan sa devet puta većom stopom smrtnosti i četiri puta dužim boravkom u bolnici (18). Pored toga, postoje brojni dokazi da je rizik od hroničnih komplikacija značajno uvećan kod pacijenata sa AOB. Studija Askenazi i sar. je pokazala da su se kod čak 40-50% pedijatrijskih pacijenata kod kojih je došlo do razvoja AOB ispoljili i znaci HBB tokom praćenja u periodu od 3 do 5 godina, što ukazuje da i subletalna oštećenja trajno menjaju bubrežni parenhim (19).

Pored alarmantnih podataka o porastu incidence AOB, sve novije pedijatrijske studije pokazuju da se i etiologija AOB značajno menja. Poslednjih decenija AOB češće nastaje kao posledica druge sistemske bolesti ili njenog lečenja, nego usled primarne bolesti bubrega (20). Najčešći uzroci razvoja AOB kod dece su sepsa, kongenitalna srčana oboljenja (primena kardiopulmonalnog bajpasa tokom kardiohirurških intervencija), hemolitičko uremijski sindrom i glomerulonefritis (10, 15). Više mehanizama je uključeno u razvoj AOB, ali se dva izdvajaju kao najučestalija: poremećaj bubrežne perfuzije i direktno oštećenje tubula bubrega (10). Oksidativni i inflamatorni procesi uzrokuju direktno oštećenje parenhima bubrega tokom AOB (15). Na osnovu uzroka, razlikuju se tri tipa AOB:

- 1) **Prerenalni tip AOB** – karakteriše smanjena perfuzija bubrega. Može nastati usled kardiovaskularnih bolesti ili stanja koja su povezana sa smanjenjem volumena krvi i krvnim pritiskom.
- 2) **Renalni tip AOB** - nastaje usled abnormalnosti u samim bubrezima (na nivou krvnih sudova, glomerula ili tubula). Najčešći uzrok renalnog tipa AOB je dugotrajna funkcionalna oligurija.
- 3) **Postrenalni tip AOB** - nastaje usled opstrukcije urinarnog trakta najčešće bubrežnim kamencima, (15).

Nekoliko studija je pokazalo da pored faktora životne sredine, na razvoj AOB kod dece može uticati i genetička predispozicija (10). Za nekoliko gena za koje se najpre pretpostavilo da mogu biti povezani sa AOB ispostavilo se kasnije da nemaju uticaja. Tako npr. polimorfizmi gena angiotenzin konvertujućeg enzima ili angiotenzin receptora, sa posledičnim promenama u aktivnosti sistema renin-angiotenzin-aldosteron, ne utiču na razvoj AOB (21). Pored toga, kod novorođenčadi su ispitivani i polimorfizmi gena faktora nekroze tumora alfa [*tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ )] i interleukina (IL): 1b, 6 i 10, kako bi se utvrdilo da li polimorfizmi ovih gena dovode do jačeg inflamatornog odgovora i predispozicije novorođenčadi za AOB (22). Učestalost alela pojedinačnih gena se nije razlikovala između novorođenčadi sa AOB i onih bez AOB, ali je TNF- $\alpha$ /IL-6 AG/GC haplotip bio prisutan u 26% novorođenčadi koji su razvili AOB u poređenju sa 6% novorođenčadi koji nisu razvili AOB. Ovo istraživanje sugerše da kombinacija ovih polimorfizama može dovesti do jačeg inflamatornog odgovora i razvoja AOB kod novorođenčadi sa infekcijom (21). Takođe, utvrđeno je da se AOB češće razvija kod novorođenčadi male telesne mase koji su nosioci varijacije genotipa G/G u proteinu toplotnog šoka 72 [*heat shock protein 72* (Hsp72)], što je povezano sa niskom inducibilnošću ovog proteina (23). Imajući u vidu važnu ulogu Hsp72 u ishemijskom oštećenju bubrega, ovi nalazi ukazuju na to da su neka novorođenčad više osetljiva na stanje ishemije.

#### ***1.1.2.1. Infekcije urinarnog trakta kao uzrok AOB kod dece***

Mogući uzrok za razvoj AOB je i teži oblik infekcije urinarnog trakta (IUT), kao posledica hipoperfuzije bubrega usled ozbiljne dehidracije organizma. IUT su druge po učestalosti bakterijske infekcije kod dece, posle respiratornih (24). IUT može da bude ograničena samo na mokraćnu bešiku (cistitis) ili da zahvati parenhim bubrega (pijelonefritis). Kod dece kod kojih je infekcijom zahvaćen parenhim bubrega postoji rizik od trajnog oštećenja bubrega, što može da ima za posledicu hipertenziju, komplikacije u trudnoći ili u najgorem slučaju, bubrežnu insuficijenciju (24, 25). Renalni ožiljak ili ožilčenje je najozbiljnija komplikacija IUT, a predstavlja fokalno ili difuzno oštećenje

parenhima bubrega. Aktuelna dijagnostička procedura za praćenje zahvaćenosti bubrega tokom IUT (gornji IUT) i inflamacije parenhima bubrega je scintigrafija bubrega uz korišćenje radiofarmaka Tehnecijum 99m dimerkaptosukcinilne kiseline (Tc 99m – DMSK) (26). Primenom scintigrafije bubrega kod dece sa IUT utvrđen je visok procenat patoloških nalaza (30-42%), (26, 27). Formiranju ožiljaka u bubrezima posebno su sklona deca uzrasta do dve godine neadekvatno lečena tokom akutnog pijelonefritisa, kao i deca sa vezikouretralnim refluksom i opstrukcionim anomalijama (28). Iako je scintigrafija bubrega najpreciznija u otkrivanju korteksnih oštećenja bubrega izazvanih IUT, ona izlaže bolesnika zračenju i skupa je dijagnostička tehnika koja nije uvek dostupna, pa je stoga potraga za neinvazivnim metodama aktuelna (29). U studiji Stokland i sar. utvrđen je visok stepen korelacije između koncentracije C reaktivnog proteina (CRP) u serumu i patoloških nalaza dobijenih primenom scintigrafije bubrega (27). CRP je direktan kvantitativan marker reakcije akutne faze i inteziteta inflamacije tokom IUT, dok dugotrajno visoke koncentracije CRP ukazuju na prolongirano zapaljenje koje može dovesti do razvoja fibroze i formiranja ožiljaka u bubregu (29).

#### ***1.1.2.2. Kardiohirurške intervencije kao uzrok AOB kod dece***

AOB je česta komplikacija i tokom kardiohirurških intervencija u pedijatriji. Kardiohirurgija sa primenom kardiopulmonalnog bajpasa [*cardiopulmonary bypass* (CPB)] je najčešća hirurška procedura koja se primenjuje u bolnicama širom sveta, sa više od milion operacija izvedenih svake godine (30). Na žalost, oštećenje bubrega ostaje među najozbiljnijim komplikacijama u kardiohirurgiji. Deca koja se zbog urođene srčane bolesti podvrgavaju kardiohirurškim intervencijama su pod visokim rizikom za razvoj AOB u neposrednom postoperativnom periodu (31-34) zbog hipotenzije, inflamacije i primene nefrotoksičnih lekova (34). Incidenca AOB u kardiohirurgiji se kreće u rasponu od 5-50%, sa visokom stopom smrtnosti od 20-79%, zavisno od definicije AOB koja se koristi (32).

U kliničkoj praksi praćenje pacijenata sa AOB nakon kardiohirurških intervencija uključuje nespecifične mere kao što su adekvatno praćenje bilansa tečnosti, hemodinamike, izbegavanje nefrotoksičnih agenasa i primenu RRT ako je potrebno. RRT je ključna

terapija kod pedijatrijskih kardiohirurških bolesnika sa AOB i preopterećenjem tečnosti, ali ne postoji konsenzus oko vremena koje je optimalno za njenu primenu, niti o modalitetu RRT. Najčešće korišćeni modaliteti akutne RRT kod pedijatrijskih kardiohirurških bolesnika su peritonealna dijaliza i kontinuirana RRT. Izbor RRT modaliteta zavisi od starosti i kliničkog stanja pacijenta, raspoloživih tehničkih sredstava i kliničkog iskustva medicinskog osoblja.

### **1.1.3. Serumski kreatinin kao marker AOB**

Blagovremeno identifikovanje dece sa AOB može biti od ključnog značaja za dalje zbrinjavanje, pogotovu što trenutni laboratorijski i klinički parametri nisu dovoljno pouzdani za detekciju akutnog oštećenja (15). Nekoliko puta povećana koncentracija kreatinina u serumu i smanjenje klirensa kreatinina predstavljaju osnovne kriterijume koji se koriste za dijagnostikovanje AOB.

Kreatinin je mali molekul od 113 D, koji se formira u mišićima neenzimskom konverzijom kreatina i fosfokreatina (35). Kreatin se sintetiše u bubrezima, jetri i pankreasu, putem krvi se transportuje do drugih organa kao što su mišići i mozak, gde se fosforiliše do visoko-energetskog jedinjenja fosfokreatina. Međusobno prevođenje kreatina i fosfokreatina je osobina metaboličkih procesa koji se odigravaju pri mišićnim kontrakcijama. Izvesna količina slobodnog kreatina u mišićima spontano se prevodi u anhidrid kreatinin. Pošto je količina endogeno stvorenog kreatinina proporcionalna mišićnoj masi, njegova produkcija zavisi od starosti i pola. Iako je stvaranje i izlučivanje kreatinina u velikoj meri konstantno tokom dana, male količine kreatinina se reapsorbuju na nivou tubula, a neznatna količina (7-10%) se pojavljuje u urinu usled tubularne sekrecije (35).

Određivanje kreatinina veoma je važno za procenu GFR. Međutim, postoji više razloga zašto serumski kreatinin nije dovoljno osetljiv i specifičan parametar bubrežne funkcije u akutnim stanjima. Interferencija u testovima za određivanje koncentracije kreatinina u serumu može uzrokovati dobijanje pogrešnih rezultata (36). Najviše korišćena kolorimetrijska metoda za merenje kreatinina Jaffe-ova reakcija detektuje kreatinin kao i



nekreatininske hromogene u serumu (37). 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, npr: glukoze, ketona, mokraćne kiseline, hemoglobina, lekova (cefalosporina, furosemida) (36). Takođe, visoke vrednosti bilirubina mogu uzrokovati lažno niske vrednosti kreatinina (37). Uvođenjem kinetičke metode sa alkalnim pikratom značajno je redukovana interferencija nekreatininskih hromogena. Pored toga, koncentracija kreatinina u serumu se može menjati usled nerenalnih faktora (pol, starost, rasa, mišićna masa, nutritivni status), dakle nezavisno od aktuelnog stanja bubrežne funkcije (36, 38). Produženo intezivno vežbanje, unos kreatin suplemenata ili pak većih količina kuvanog mesa može uzrokovati povećanje serumskog kreatinina. Neki lekovi (trimetoprim, cimetidin, salicilati) menjaju tubularnu sekreciju kreatinina što rezultuje izmenama njegove koncentracije u serumu nezavisno od promena GFR (36). Takođe, bitno je napomenuti da promene u koncentraciji kreatinina u serumu mogu kasniti i par dana u odnosu na aktuelnu promenu GFR (7). Čak i klirens kreatinina koji se često koristi za procenu bubrežne funkcije ima nedostatak osetljivosti u slučaju blagih oštećenja, a može biti i pod uticajem tubularne sekrecije kreatinina.

Kako sam kreatinin ima niz nedostataka kao marker za procenu GFR, predloženo je da se koncentracija kreatinina u serumu zameni jednačinom za procenu GFR koja pored vrednosti kreatinina uzima u obzir i antropometrijske podatke kao što su pol, starost, etnička pripadnost, čime bi se kompenzovao uticaj mišićne mase na vrednosti kreatinina. Problem postoji i u ovom slučaju jer najveći broj ovih jednačina koristi prosečnu mišićnu masu za osobe određene starosti, pola i etničke pripadnosti, pa ukoliko mišićna masa pojedinca odstupa od proseka odgovarajuće populacione grupe, jednačina koja se koristi za procenu GFR za tu osobu neće biti tačna (35). Ovo je ujedno i objašnjenje zašto je bilo neophodno formulisati više jednačina za maksimalnu dijagnostičku tačnost u različitim populacionim grupama. Različite formule kao što su Cockcroft-Gault-ova (39) i MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) (40) su uvedene za izračunavanje GFR na osnovu koncentracija serumskog kreatinina. Kod dece se za izračunavanje GFR primenjuje Schwartz-ova formula (14):

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

koeficijent k ima vrednost 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.

#### **1.1.4. Kriterijumi za uključivanje novih biomarkera AOB u kliničku praksu**

Jasno je da postojeći dijagnostički test za AOB, kreatinin u serumu, ima niz nedostataka. Kao funkcionalni marker glomerularne filtracije kreatinin raste kasno u AOB patofiziologiji, kad je već došlo do značajnog oštećenja bubrega, a veliki deo kapaciteta za filtraciju izgubljen. Sa druge strane, ispitivanja na životinjama su pokazala da terapiju koja sprečava ili ublažava AOB treba primeniti veoma rano posle oštećenja, a sigurno pre nego što koncentracija kreatinina u serumu počne da raste (6). Dakle, rana dijagnoza AOB i blagovremena primena terapije su od ključnog značaja za dalje zbrinjavanje pacijenata. Tome u prilog ide podatak da čak i malo povećanje serumskog kreatinina (50% ili 26,5  $\mu\text{mol/L}$ ) može biti povezano sa smrtnim ishodom bolesnika (12).

Zbog svega navedenog postoji potreba za uvođenjem ranih pokazatelja oštećenja bubrega tzv. biomarkera, proteina i drugih molekula u serumu i urinu, koji će pomoći u dijagnostici, prognozi i praćenju toka AOB tokom primene terapije. Radna grupa za biomarkere je definisala biološki marker (biomarker) kao "karakteristiku koja se objektivno meri i ocenjuje kao indikator fizioloških ili patofizioloških procesa u organizmu, kao i farmakološkog odgovora na primenjenu terapeutsku intervenciju" (41). Poželjne karakteristike biomarkera bubrežnih oboljenja su:

- neinvazivnost, odnosno da se mogu odrediti korišćenjem lako dostupnih uzoraka kao što su krv ili urin;
- da se brzo i pouzdano mere standardizovanim testovima uz prihvatljive troškove;
- da su visoko osetljivi za ranu detekciju oštećenja bubrega sa definisanim graničnim vrednostima koje omogućavaju precizno razdvajanje zdravih i bolesnih osoba;
- da su visoko specifični za AOB;

- da pokazuju odgovarajuću dijagnostičku tačnost izračunatu preko ROC krive (*receiver operating characteristic curve*);
- da daju korisnu kliničku informaciju koju je lako interpretirati kao dopunu konvencionalnim kliničkim faktorima, (42).

Takođe, važno je da se njihove vrednosti menjaju samo zbog oštećenja bubrega, a ne zbog infekcije, inflamacije i drugih uzroka. Pored rane dijagnoze, biomarkeri su neophodni iz više razloga u oblasti dijagnostike AOB:

- utvrđivanje lokacije primarnog oštećenja (proksimalni ili distalni tubuli, intersticijum ili krvni sudovi);
- razlikovanje tipa AOB (prerenalni, renalni ili postrenalni);
- utvrđivanje etiologije AOB (ishemija, dejstvo toksina, sepsa ili kombinacija);
- razlikovanje AOB od drugih akutnih oboljenja bubrega (IUT, glomerulonefritisa ili intersticijalnog nefritisa);
- procene rizika i prognoze (trajanje i stepen jačine AOB, potreba za primenom RRT, dužine boravka u bolnici i stope mortaliteta);
- praćenje odgovora na primenjen tretman za AOB, (43).

U pogledu poželjnih karakteristika AOB biomarkera, najvažnija je ipak klinička primena koja može omogućiti ranu dijagnozu i lečenje AOB. Blagovremena dijagnoza AOB sa specifičnim bubrežnim biomarkerom može rezultovati ranijom konsultacijom sa nefrologom, optimalnim doziranjem antibiotika, izbegavanjem nefrotoksičnih agenasa i adekvatnom terapijom sa pozitivnim učinkom na bubrežnu funkciju. Međutim, kako bi se obezbedila adekvatna klinička primena biomarkera i interpretacija rezultata neophodna je njihova sistematska procena u različitim kliničkim stanjima sa AOB. Osim toga, malo je verovatno da će jedan biomarker dosledno obezbediti dovoljnu preciznost za blagovremenu dijagnozu AOB u svim kliničkim stanjima, tako da se kombinacijom biomarkera mogu formirati paneli za specifične bolesti ili se može povećati preciznost (15).

#### **1.1.4.1. Uzorci za određivanje biomarkera AOB**

Što se tiče uzorka za određivanje biomarkera, oni se najlakše mogu odrediti iz urina i krvi, koji se inače dobijaju tokom uobičajene nege pacijenta, lako se mogu prikupiti uz postelju pacijenta, i njihovo prikupljanje je bez rizika po zdravlje pacijenta (44). Međutim, svaki uzorak ima pozitivne i negativne karakteristike.

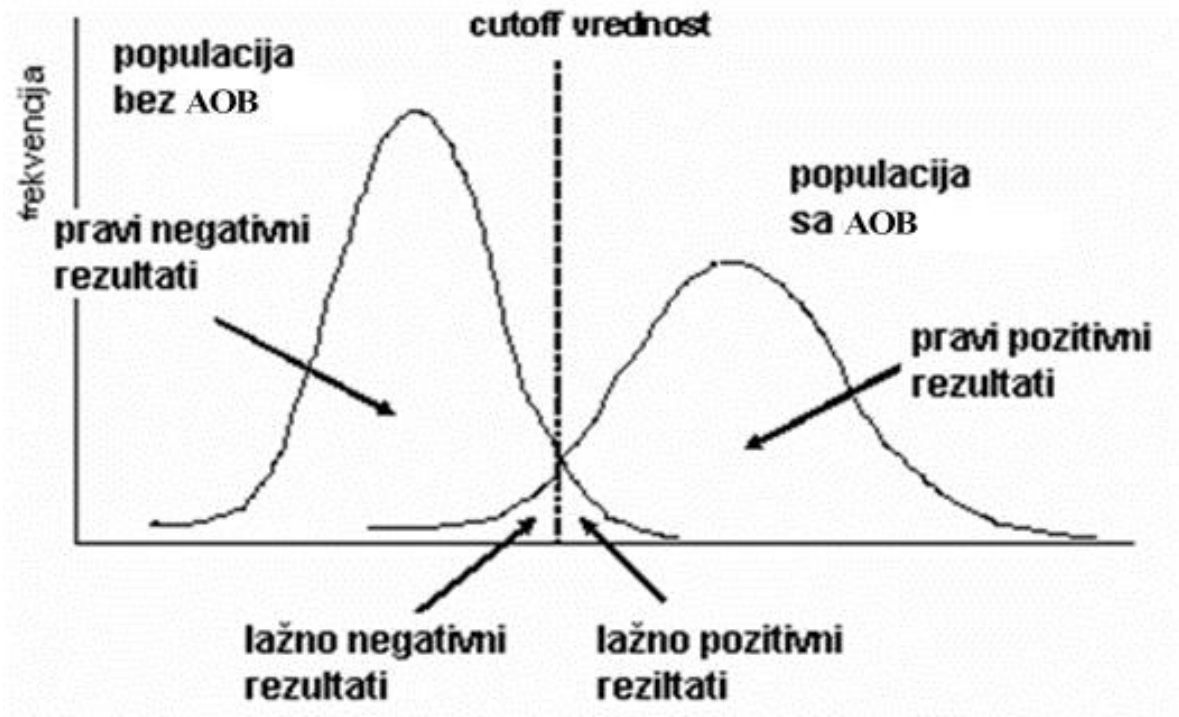
**Urin** je odličan izvor biomarkera stvorenih u bubrezima i na taj način može dati bolji uvid u mehanizme specifičnih bubrežnih bolesti (6). Takođe, urin je manje kompleksan od seruma i na taj način je pogodniji uzorak za određivanje biomarkera. Prikupljanje urina je lako, pa se može koristiti i u kućnim uslovima za testiranje. Međutim, čuvanje urina u velikoj meri utiče na stabilnost proteina i merenja bi trebalo izvesti odmah posle prikupljanja ili urin treba zamrznuti na  $-80^{\circ}\text{C}$  kako bi se izbegla degradacija proteina (44). U većini studija koje su ispitivale urinarne biomarkere, koncentracija biomarkera je izražavana u odnosu na koncentraciju kreatinina u urinu (tzv. normalizovane vrednosti), u cilju uračunavanja razlika u koncentraciji urina zbog izmena u statusu hidratacije organizma i upotrebe lekova, kao što su diuretici. Međutim, korisnost kreatinina u korekciji koncentracije biomarkera u urinu je pod pitanjem zbog njegovog promenljivog izlučivanja tokom dana u akutnim stanjima kada je za postizanje ravnotežnog stanja potrebno više sati, pa čak i dana (7).

**Serum ili plazma** takođe mogu biti dobar uzorak za određivanje biomarkera, pogotovu kod anuričnih pacijenata. Serum je manje sklon bakterijskim kontaminacijama nego urin i smatra se stabilnijim uzorkom. Biomarkeri koji se određuju iz seruma, međutim više predstavljaju sistemski odgovor organizma na bolest, a manje odgovor samog organa (44). Problem sa serumom kao uzorkom za određivanje biomarkera leži već u fazi njihovog otkrivanja, pošto serum sadrži širok spektar proteina prisutnih u različitim koncentracijama, od kojih mali broj proteina, kao što je to npr. albumin, čini veći deo zapremine seruma. Proteini koji su prisutni u visokoj koncentraciji ometaju određivanje onih koji su prisutni u niskim koncentracijama. Iako postoje metode za uklanjanje dominantnih proteina iz seruma, za mnoge potencijalne biomarkere je utvrđeno da se vezuju za albumin (45), pa se uklanjanjem albumina iz seruma mogu izgubiti i proteini relevantni za datu bolest.

#### **1.1.4.2. Određivanje efektivnosti biomarkera AOB**

Za procenu efektivnosti nekog laboratorijskog testa najčešće se koristi: procenat pravih pozitivnih (PP), pravih negativnih (PN), lažno pozitivnih (LP), lažno negativnih (LN) rezultata, osetljivost, specifičnost, dijagnostička tačnost preko izračunavanja površine ispod ROC-krive [*area under the curve* (AUC)] (46).

Upotrebljivost testa u dijagnostici određene bolesti zavisi od njegove tačnosti, što je pak uslovljeno različitim faktorima kao što je stadijum same bolesti, kao i druge bolesti koje se pojavljuju u populaciji na kojoj se ispituje dijagnostička vrednost testa. Iz ovog razloga najbolje je da populacija na kojoj se proverava ima slične karakteristike kao populacija na kojoj će se test kasnije primenjivati. Dijagnostičke karakteristike laboratorijskih određivanja, tj. dijagnostička osetljivost i specifičnost pružaju informacije o tome koliko je neki parametar koristan (npr. da li je podesan za skrining, u diferencijalnoj dijagnozi ili za potvrdu nesigurne dijagnoze), (46, 47). **Osetljivost određivanja** odgovara njegovoj mogućnosti da otkrije stvarno bolesne i definiše se kao broj PP u procentima od ukupnog broja bolesnih. Dobar dijagnostički marker visoke osetljivosti ima sposobnost da kod obolelih osoba detektuje visok procenat pozitivnih rezultata. **Specifičnost određivanja** odgovara njegovoj mogućnosti da otkrije zdrave i definiše se kao broj PN u procentima od ukupnog broja zdravih. Dobar dijagnostički marker visoke specifičnosti ima sposobnost da kod zdravih osoba detektuje visok procenat negativnih rezultata. Pozitivni rezultati koji se dobijaju kod pacijenata koji nemaju bolest označavaju se kao LP, a negativni rezultati koji se dobijaju kod pacijenata koji imaju bolest označavaju se kao LN.



**Slika 1:** Dijagnostičke karakteristike laboratorijskih određivanja  
(modifikovano prema referenci 46)

Slika 1 ilustruje hipotetičku raspodelu vrednosti određivanja u dve dijagnostičke grupe (zdravi – bez AOB i bolesni – sa AOB). Što je manje preklapanje ove dve krive raspodele, veća je mogućnost da je donešena prava odluka, odnosno da je postavljena prava dijagnoza. Pomeranjem cut off granice ka nižim vrednostima dolazi do povećanja osetljivosti, ali se smanjuje specifičnost, tj. povećanje PP rezultata vodi ka povećanju LP rezultata. Idealnim određivanjem trebalo bi da se dobije pozitivan rezultat kod svakog obolelog i negativan rezultat kod zdravog. Međutim, nijedno određivanje ne zadovoljava ove idealne standarde, odnosno nije oslobođeno LP i LN rezultata (46). Osetljivost i specifičnost se menjaju inverzno. Ukoliko je više PP rezultata kod bolesnih to će verovatno biti nađen manji broj PN kod zdravih. Testovi koji imaju visoku osetljivost imaju mali procenat LN rezultata, tako da oni omogućavaju da se detektuju sve bolesne osobe. Visoka osetljivost je važna za testove koji se koriste kao skrining za neke bolesti, kada je važno da

se ne propusti nijedna bolesna osoba (47). LP rezultati koji mogu da se pojave u ovim slučajevima nisu poželjni, ali mogu da se tolerišu jer se dodatnim testovima utvrđuje da li je bolest prisutna ili ne. Visoka specifičnost je potrebna za konfirmatorne testove, odnosno testove kojima se potvrđuje neka dijagnoza, posebno u slučajevima kada se posle njih primenjuje neka invazivna dijagnostička metoda ili agresivna terapija (47). U ovim slučajevima nisu poželjni LP rezultati, jer bi to značilo da se zdrava osoba podvrgava nepotrebnom tretmanu.

#### ***1.1.4.3. Troškovna isplativost biomarkera AOB***

Sa ekonomske tačke gledišta, AOB je povezano sa većim utroškom finansijskih sredstava usled dužeg boravka ovih pacijenata u bolnici, ali i većih troškova povezanih sa dugoročnim posledicama (48-50). Procena je da su godišnji troškovi zdravstvene zaštite pripisane lečenju AOB, više od 10 milijardi dolara samo u Sjedinjenim Američkim Državama (50, 51). Poslednjih decenija ulažu se veliki naponi kako bi se dijagnostika AOB unapredila, pri čemu se velike nade polažu u biomarkere AOB. Međutim, neselektivna upotreba različitih biomarkera može udaljiti lekare od adekvatne kliničke procene, ali i neefikasno trošiti značajne svote novca (52). Pošto su budžeti svih zdravstvenih sistema postali restriktivniji, podržana je primena analize odnosa troškova i efektivnosti, kao i drugih srodnih analitičkih metoda isplativosti za procenu novih dijagnostičkih i terapijskih intervencija u cilju efikasnije preraspodele finansijskih sredstava u zdravstvu (53).

#### **1.1.5. Biomarkeri AOB - rani pokazatelji oštećenja bubrega**

Do sada je identifikovan veliki broj potencijalnih biomarkera bubrežnih oboljenja, koji se radi lakšeg sagledavanja mogu grupisati u kategorije koje predstavljaju različiti tip bubrežnog oštećenja (tabela 4), (1).

**Tabela 4:** Kategorije biomarkera bubrežnih oboljenja

Klinički	Funkcionalni	Oksidativni stres	Strukturna i ćelijska oštećenja	Imunološki odgovor	Fibroza
Krvni pritisak	Brzina glomerularne filtracije	Uznapredovali krajnji produkti glikozilacije	Albuminurija	Hemokini	Profibrotski faktori rasta
Izlučivanje urina	Markeri kapilarnog pritiska	Uznapredovali krajnji produkti lipoksidacije	Markeri oštećenja podocita	Inflamatorni citokini	Fragmenti solubilnog matriksa
Genetička ispitivanja	Markeri kapilarnog protoka	Reaktivni metaboliti kiseonika	Markeri tubularnog oštećenja	Molekuli ćelijske adhezije	
		Reaktivni metaboliti azota		Imunoglobulini	
				Komponente komplementa	

Tabela modifikovana prema referenci broj 1

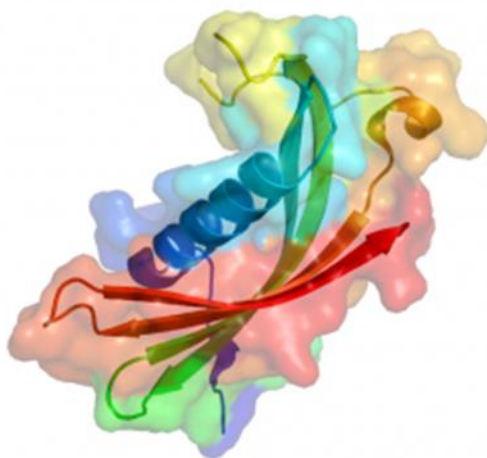
Tokom protekle decenije sprovedena su značajna istraživanja nekoliko biomarkera za ranu dijagnozu AOB, uključujući cistatin C [*Cystatin-C* (Cys-C)], lipokalin [*neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL)], molekul oštećenja bubrega-1 [*kidney injury molecule-1* (KIM-1)], jetreni tip vezujućeg proteina za masne kiseline [*liver-type fatty acid-binding protein* (L-FABP)] (54).

#### 1.1.5.1. Cistatin C

Cys C je prvi put otkriven 1961. godine kao alkalni protein u normalnoj cerebrospinalnoj tečnosti (55). Nekoliko trivijalnih imena je korišćeno za ovaj protein (post  $\gamma$  globulin, post  $\gamma$  protein, *high alkaline fraction*-HAF,  $\gamma_c$  globulin), sve dok ispitivanjem primarne strukture nije utvrđena njegova funkcija kao inhibitora cistein proteaza. Poznato



je 12 proteina koji sadrže polipeptidni lanac sa sekvencom homolognom Cys C i oni formiraju cistatin proteinsku superfamiliju inhibitora cistein proteaza (56). Cys C je naj snažniji humani inhibitor značajnih cistein proteaza, kao što su katepsin K i H, a nasuprot drugim cistatinima prisutan je u značajnoj koncentraciji u svim ispitivanim humanim telesnim tečnostima (57). Cys C je neglikozilirani protein molekulske mase 13 kD, a čini ga polipeptidni lanac od 120 aminokiselinskih ostataka, (slika 2).



**Slika 2.** Kristalografska struktura Cys C \*

Cys C proizvode i oslobađaju u krvotok humane ćelije sa jedrom konstantnom brzinom. Na nivou bubrega Cys C se slobodno filtrira u glomerulima, u potpunosti reapsorbuje u proksimalnim tubulima gde se i degradira, ali se ne sekretuje u tubulima (58). Plazma renalni klirens Cys C iznosi 94% uobičajeno korišćenog markera za procenu GFR  $^{51}\text{Cr}$  EDTA, što znači da se Cys C u potpunosti slobodno filtrira u glomerulima (59). Pored toga određena ograničenja serumskog kreatinina, kao što su uticaj tubularne sekrecije, mišićne mase, ishrane, pola ne predstavljaju problem u slučaju Cys C (60). Brojne studije su pokazale da vrednosti Cys C u serumu pokazuju bolje karakteristike u proceni GFR u odnosu na serumski kreatinin, pogotovu za smanjenja GFR u opsegu 60-80 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (61, 62). Znatna procenata pacijenata sa smanjenom GFR pokazuje vrednosti serumskog

---

\* <http://www.rcsb.org/pdb/explore>

kreatinina u okviru referentnog intervala, pa čak je i smanjenje GFR za 50% često praćeno normalnom koncentracijom kreatinina. Cys C poseduje veću dijagnostičku tačnost u ovom „slepom kreatinin području“ i pomaže lekarima da dobiju raniju indikaciju pogoršanja bubrežne funkcije. Na osnovu toga je Cys C koristan biomarker za dijagnostiku AOB, koji može utvrditi razvoj AOB jedan do dva dana pre serumskog kreatinina (63). Korišćenje Cys C za procenu GFR je posebno pogodno za pedijatrijsku populaciju, kod starijih osoba i osoba sa redukovanom mišićnom masom. Studije koje su sprovedene u pedijatrijskoj populaciji pokazale su da su markeri Cys C i  $\beta_2$ -mikroglobulin pogodniji za utvrđivanje AOB u odnosu na kreatinin (GFR ispod 80 mL/min/1,73m<sup>2</sup>) (64). Cys C je bolji marker GFR u pedijatrijskoj populaciji jer se može koristiti uniformni referentni interval koji ne zavisi od godišta. Visoke koncentracije Cys C na rođenju, pa zatim brzo opadanje nakon rođenja, odražavaju sazrevanje bubrežne funkcije. Za razliku od serumskog kreatinina, Cys C se može koristiti i za procenu GFR kod novorođenčadi, pa čak i fetusa.

Razlog zašto Cys C pokazuje porast vrednosti pre serumskog kreatinina pri akutnoj promeni bubrežne funkcije nije sasvim razjašnjen. Moguće objašnjenje zašto se uvećanje Cys C detektuje ranije u odnosu na kreatinin leži u tome da nekoliko bubrežnih oboljenja karakteriše umanjene veličine glomerularnih pora pre nego što se može registrovati promena GFR, tako da je koncentracija proteina koji se normalno filtriraju na nivou glomerularne membrane (Cys C,  $\beta_2$ -mikroglobulina,  $\alpha_1$ -mikroglobulina) višestruko uvećana iako se vrednost GFR ne menja značajno (65).

Međutim, ipak postoje i određena ograničenja za upotrebu Cys C kao markera GFR. Poremećaj funkcije štitne žlezde (66) kao i terapija glukokortikoidima (67) mogu uticati na vrednosti Cys C nezavisno od bubrežne funkcije. Hipertireoidizam i tretman tiroksinom uzrokuju uvećanje koncentracije Cys C i umanjene kreatinina u krvi (66). Iako je pokazano da smanjenje kreatinina može biti posledica uvećane tubularne sekrecije kreatinina, razlog zbog čega se uvećava vrednost Cys C nije poznat. Primena srednjih i visokih doza glukokortikoida rezultuje uvećanjem sinteze Cys C i sledstvene povećane koncentracije Cys C u krvi, što pogrešno upućuje na smanjenje GFR (67). Uvećanje koncentracije Cys C u krvi je dozno zavisno, tako da primena niskih doza glukokortikoida ne interferira značajno sa korišćenjem Cys C kao markera GFR. Takođe, bitno je naglasiti da topikalna

primena glukokortikoida ne interferira sa primenom Cys C kao markera GFR, dok peroralna i parenteralna primena rezultuju značajnom interferencijom. Pored toga, pri tumačenju povišenih vrednosti treba imati u vidu da Cys C spada u markere inflamacije, zbog čega se mogu očekivati i promene vrednosti Cys C u zapaljenskim reakcijama, pa je poželjno istovremeno određivanje i CRP (68).

Pošto je Cys C manje zavisao od antropometrijskih podataka u odnosu na kreatinin, jednačine za procenu GFR koje su bazirane na vrednostima Cys C su znatno jednostavnije, a mogu se koristiti i za decu i za odrasle. Do sada je predložen veliki broj jednačina za procenu GFR na osnovu vrednosti kreatinina i Cys C. Razlog ovome je upotreba različitih kalibratora, nedovoljno tačnih metoda za određivanje kreatinina i Cys C, kao i različitih matematičkih modela za generisanje predikcionih jednačina. Upotreba validiranih internacionalnih kalibratora (69, 70) i tačnih metoda za određivanje kreatinina i Cys C smanjiće broj jednačina za procenu GFR i pojednostaviće odabir jednačine koja je podesna za specifičnu populacionu grupu kojoj pripada pacijent. Iako je pokazano da jednačine za procenu GFR koje uvrste vrednost oba markera kreatinin i Cys C imaju bolju dijagnostičku tačnost u odnosu na one koje se baziraju na vrednosti samo jednog markera, ipak nisu optimalne u svim kliničkim situacijama. U slučaju pacijenata koji boluju od paralize, ili pak imaju jako malu mišićnu masu primena kombinovane jednačine daje lošiju procenu GFR u odnosu na onu dobijenu samo na osnovu vrednosti Cys C. Nasuprot tome, u slučaju primene srednjih i visokih doza glukokortikoida jednačine bazirane samo na vrednosti kreatinina daju tačniju procenu GFR u odnosu na kombinovane jednačine. Zbog ovakvih situacija u kliničkoj praksi predložen je i usvojen Lund-ov model koji se bazira na tri izvora informacija: koncentraciji kreatinina i Cys C u serumu, i kliničkog konteksta (71). GFR ( $\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ) se procenjuje iz jednačina koje koriste zasebno vrednosti kreatinina i Cys C, pri čemu se dve dobijene vrednosti najpre porede međusobno, i ukoliko se one slažu u određenim granicama uzima se srednja vrednost ove dve procene. Smatra se da je vrednost GFR procenjena na ovaj način pouzdana koliko i ona dobijena primenom invazivne procedure zlatnog standarda (plazma klirens ioksenola). Ukoliko se vrednosti dobijene iz obe jednačine koje koriste zasebno vrednosti kreatinina i Cys C ne uklapaju, razmatraju se mogući razlozi, npr. primena visokih doza glukokortikoida ili pak neubičajeno mala

mišićna masa pacijenta. U slučaju da se ne utvrdi razlog odstupanja između dve vrednosti za GFR neophodno je primeniti invazivnu proceduru zlatnog standarda (71).

### ***1.1.5.2. Lipokalin***

Lipokalini čine superfamiliju proteina koji se odlikuju sposobnošću da vezuju male, hidrofobne molekule (vitamine, hormone) u strukturne džepove formirane od  $\beta$ -presavijenih ploča i da grade makromolekulske komplekse (72). NGAL je mali protein iz lipokalin superfamilije koji je primarno izolovan iz supernatanta aktiviranih neutrofila (73), ali je takođe u manjoj meri prisutan i u drugim tkivima, uključujući bubrege, prostatu, epitel respiratornog i digestivnog trakta (74). NGAL ima nekoliko sinonima:

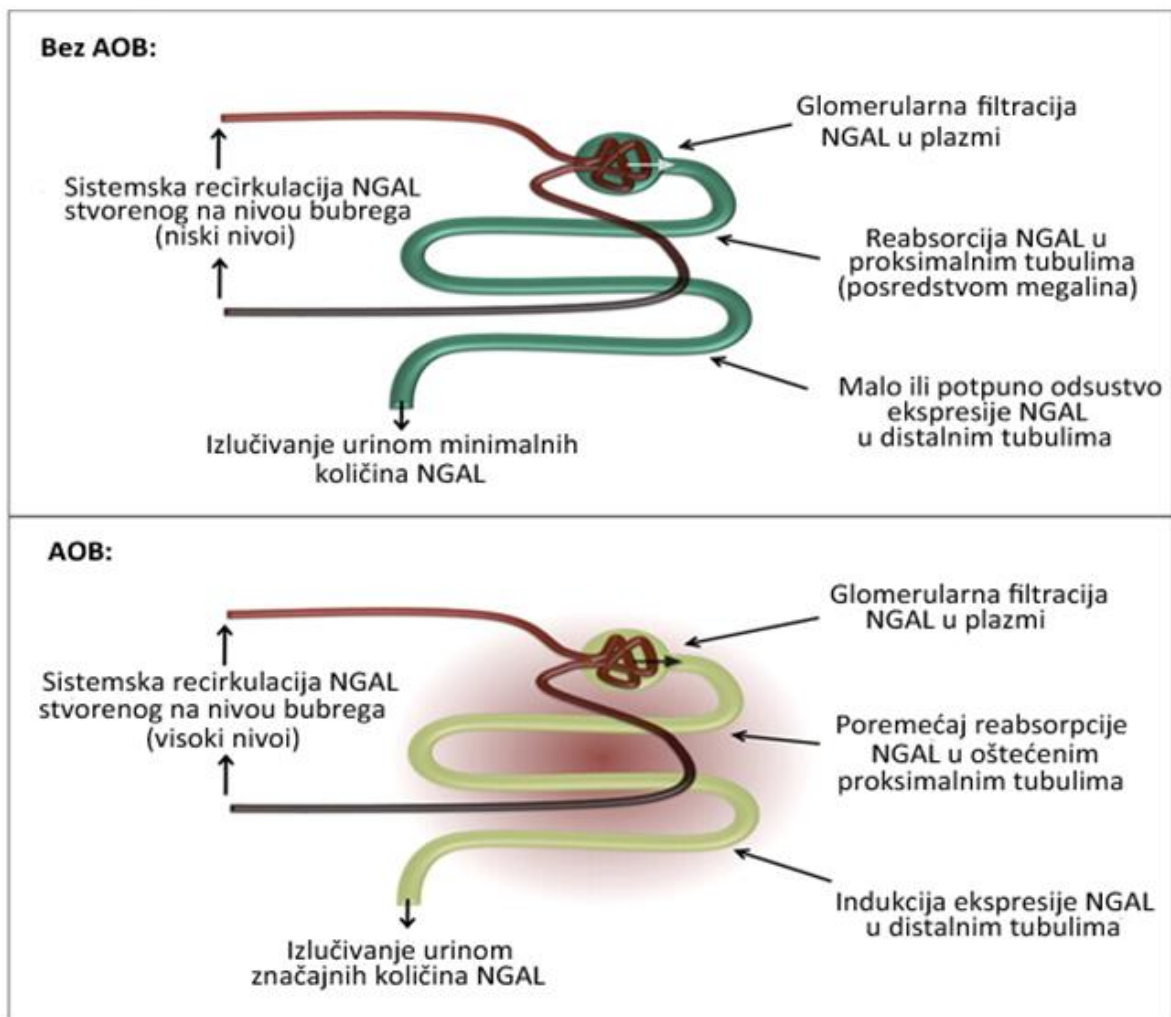
- neutrofilni lipokalin (NL ili HNL za humanu formu) (75);
- lipokalin 2, onkogen protein 24p33 ili uterokalin kod miševa (76);
- neu-srodni lipokalin (77) ili 25 kDa  $\alpha_2$ -mikroglobulin-srodni protein kod pacova (78).

Humana forma NGAL se sastoji iz jednog polipeptidnog lanca povezanog disulfidnim mostovima koji sadrži 178 aminokiselinskih ostataka, molekulske mase oko 22 kDa koja se glikozilacijom uvećava na 25 kDa, (73).

U neutrofilima i u urinu NGAL je uglavnom prisutan kao monomer, a 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) (73, 79). U tom kompleksu NGAL štiti MMP-9 od degradacije, održavajući na taj način njenu proteolitičku aktivnost. 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", npr. u slučaju inflamacije, infekcije, ishemije ili neoplastične transformacije (42). NGAL predstavlja komponentu urođenog imunog sistema, uključenu u nekoliko

ćelijskih odgovora: proliferaciju i diferencijaciju ćelija, apoptozu, bakteriostazu (72, 80). NGAL ispoljava bakteriostatske osobine tako što vezuje enterobaktin (siderofor) oduzimajući  $Fe^{+3}$  mikroorganizmima i inhibirajući na taj način njihov dalji rast i razvoj (81). Takođe, smatra se da NGAL ima i ulogu faktora rasta i diferencijacije u više tipova ćelija, uključujući bubrežni epitel gde funkcioniše kao anti-apoptotični “faktor preživljavanja“, tako što štiti bubrege od akutnog ishemijskog oštećenja (82, 83).

Za sada je poznato da bubrezi ne predstavljaju jedini izvor NGAL u krvi, već je značajna NGAL ekspresija utvrđena i u drugim organima (74), a povećano oslobađanje NGAL u cirkulaciju može formirati sistemski depo. Teoriji formiranja sistemskog depoa ide u prilog i činjenica da je NGAL protein akutne faze i da ga oslobađaju neutrofili, makrofage i druge ćelije imunog sistema. Pored toga, pošto se NGAL filtrira na nivou glomerula i reapsorbuje u proksimalnim tubulima efikasnom megalin posredovanom endocitozom (84), svako umanjenje GFR uzrokuje i smanjenje renalnog klirensa NGAL i njegovu akumulaciju u sistemskoj cirkulaciji. Merenje koncentracije NGAL u serumu (sNGAL) i NGAL u urinu (uNGAL) se pokazalo korisnim u različitim kliničkim stanjima koja mogu dovesti do AOB (kardiohirurške intervencije, transplatacija bubrega, primena nefrotoksičnih agenasa, hemolitičko uremijski sindrom). Međutim, određivanje koncentracije NGAL može biti pod uticajem brojnih faktora kao što su: HBB, sistemska infekcija, inflamatorna stanja, malignitet (85-87), ali je uvećanje NGAL u ovim kliničkim stanjima uvek mnogo manje nego u slučaju AOB. Razlike u transportu NGAL kroz nefron u stanjima AOB u odnosu na normalnu bubrežnu funkciju prikazane su na slici 3. Dakle, NGAL može predstavljati rani, osetljiv, neinvazivni biomarker za ishemijsko i nefrotoksično oštećenje bubrega. Biopsijom bubrega kod pacijenata sa AOB utvrđena je značajna akumulacija imunoreaktivnog NGAL u kortikalnim tubulima (88), što potvrđuje da je NGAL osetljiv marker koji može predvideti razvoj AOB 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 AOB, dužinom boravka u bolnici i stopom smrtnosti. Obično se za predikciju AOB za NGAL koriste cut off vrednosti od 150 ng/mL (89, 90).



**Slika 3.** Poređenje transporta NGAL kroz nefron u AOB u odnosu na normalnu bubrežnu funkciju (*modifikovano prema referenci broj 84*)

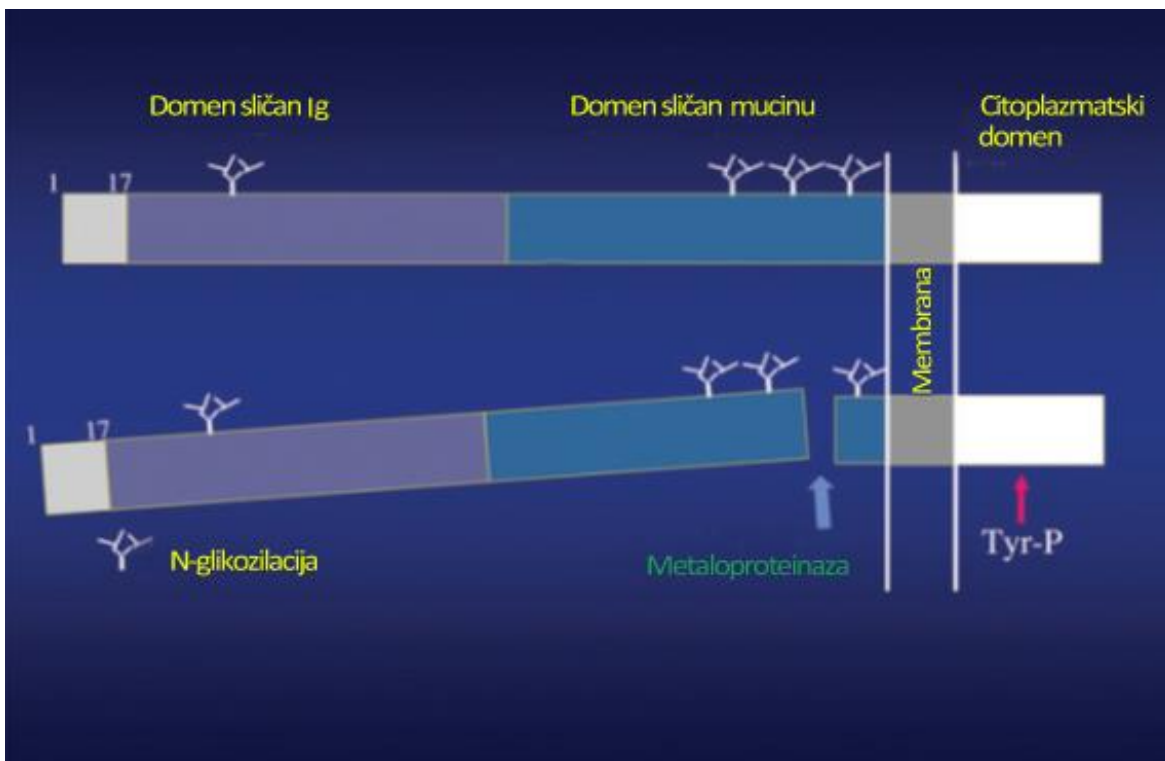
Takođe, koncentracija uNGAL i uNGAL/kreatinin odnos se mogu koristiti kao osetljivi markeri za ranu detekciju IUT u odsustvu akutnog ili hroničnog oštećenja bubrega (91). Optimalna cut off vrednost za detekciju IUT je niža u odnosu na onu koja se koristi za dijagnostiku AOB (cut off za uNGAL iznosi 20 ng/mL ili 30 ng/mg kreatinina). Pored toga, NGAL je i marker HBB i pokazuje visok stepen korelacije sa koncentracijom kreatinina u serumu, GFR i proteinurijom (85).

Dakle, NGAL ima dobre karakteristike kao marker bubrežne funkcije, ali je ujedno i marker inflamacije tako da se ne može primeniti za dijagnozu AOB u svim kliničkim stanjima.

### ***1.1.5.3. Molekul oštećenja bubrega-1***

KIM-1 je otkriven pri ispitivanju molekula uključenih u patogenezu AOB (92). U eksperimentima na pacovima utvrđeno je da dolazi do povećane ekspresije gena koji kodira sintezu ovog proteina nakon ishemijskog oštećenja bubrega (kod glodara se upotrebljava oznaka Kim-1) (93). Pošto je ekspresija KIM-1 utvrđena i u limfocitima, ali u znatno manjoj meri, KIM-1 je označen i kao T-ćelijski imunoglobulinski mucin-1 [*T-cell immunoglobulin mucin-1* (TIM-1)] i ćelijski receptor hepatitis A virusa [*hepatitis A virus cellular receptor-1* (HAVCR-1)] (94).

KIM-1 je glikoprotein ćelijske membrane tipa 1 koji u okviru molekule sadrži ekstracelularni deo sa domenima sličnima imunoglobulinima i mucinu, sa mestima N-glikozilacije i O-glikolizacije, transmembranski i kratak intracelularni domen sa fosforilisanim tirozinom (slika 4) (95). Struktura ovog proteina sugeriše adhezione karakteristike KIM-1 u ćelija-ćelija i/ili ćelija-matriks intrerakcijama (96). Sa oštećenjem tubula bubrega, dolazi do odvajanja ekstracelularnog od transmembranskog domena dejstvom proteolitičkih enzima metaloproteinaza, i pojave solubilne forme KIM-1 u urinu (97).



**Slika 4:** Struktura molekula oštećenja bubrega-1  
(modifikovano prema referenci broj 94)

KIM-1 je prisutan u niskoj koncentraciji kod osoba sa normalnom bubrežnom funkcijom, dok je ushodna regulacija veoma izražena u proksimalnim tubulima posle ishemijskog ili toksičnog AOB (42). Ispitivanja na životinjama su pokazala da KIM-1 potiče iz oštećenih delova proksimalnih tubula, bez obzira na patofiziološko mesto dediferencijacije epitelijuma, koja predstavlja veoma ranu manifestaciju odgovora epitelnih ćelija na oštećenja (98). Smatra se da su proksimalni tubuli posebno osetljivi na ishemijsko oštećenje, jer ćelije iz ovog segmenta tubula podležu aktivnom procesu dediferencijacije i proliferacije nakon ishemijske, usled čega se i njihova morfologija značajno menja (99). Sa oštećenjem KIM-1 se povećano stvara i biva lokalizovan na apikalnoj membrani proksimalnih tubula, na mestu gde su tubuli najviše oštećeni. U slučaju eksperimentalno izazvane ishemijske kod pacova, ekspresija KIM-1 je dominantna u S3 segmentu proksimalnih tubula, dok je u ishemijskom i toksičnom AOB kod ljudi KIM-1 pronađen u



tri segmenta proksimalnih tubula (94). Povećana ekspresija KIM-1 je prisutna i kod pacijenata sa karcinomom bubrega, jer je i karcinom praćen dediferencijacijom ćelija proksimalnih tubula (100).

U poslednje vreme se sve više ispituje uloga KIM-1 u bolestima bubrega. KIM-1 je jedinstven po tome što transformiše epitelne ćelije proksimalnih tubula bubrega u semiprofesionalne fagocite (101, 102). Smatra se da zapravo KIM-1 pomaže epitelnim ćelijama da prepoznaju i procesom fagocitoze odstrane mrtve ćelije koje su prisutne u bubrezima nakon ishemije i doprinose opstrukciji lumena tubula što je karakteristično za AOB (95). Nakon oštećenja, uklanjanje apoptotskih ćelija i nekrotičnog debrisa je neophodno za ublažavanje i sprečavanje inflamacije i regeneraciju tkiva. KIM-1 je receptor za fosfatidilserin i oksidovane lipoproteine koje apoptotične ćelije ispoljavaju na svojoj površini i time postaju prepoznatljive fagocitima da ih uklone, (95, 101). KIM-1 posreduje u procesu fagocitoze ne samo vezivanjem za površinu ćelija nego i podsticanjem internalizacije i usmeravanjem ka lizozomima. Rezultati studije Ischimura i sar. (101) podržavaju važnu ulogu tzv. “fagocita amatera” u remodeliranju tkiva, što je do sada pokazano kao značajno kod beskičmenjaka, ali je malo istraživano kod kičmenjaka.

Pored toga, pretpostavlja se da je KIM-1/TIM-1 važan modulator imunološkog odgovora. Nedavna studija Yamanishi i sar. je identifikovala KIM-1/TIM-1 kao endogeni ligand za tzv. receptor 5 sličan leukocitnom mono-imunoglobulinu [*leukocyte mono-Ig-like receptor 5* (LMIR5)] koji je pre svega prisutan na mijeloidnim ćelijama (103). Kod modela bubrežne ishemije, nedostatak LMIR5 umanjio je akumulaciju neutrofila i tubularnu nekrozu, što ukazuje na to da interakcija KIM-1/TIM-1 i LMIR5 podstiče inflamatornu reakciju mijeloidnih ćelija na akutno oštećenje. KIM-1/TIM-1 ekspimiraju i CD4<sup>+</sup> T ćelije tokom razvoja T ćelija pomagača [*helper T-cell2* (Th2)], koje su vrlo bitne u proinflamatornom odgovoru, jer ove ćelije proizvode veliku količinu interleukina (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) u prisustvu antigena (104).

KIM-1 se u poslednje vreme ispituje i kao marker bubrežne funkcije, kao i njegova stabilnost u različitim kliničkim stanjima. Kako kod drugih organa nije utvrđena ekspresija KIM-1 u stepenu koji bi uticao na ekskreciju urinom, njegovo prisustvo u urinu je veoma specifično za oštećenje bubrega. Sve veći broj studija na životinjama, a u poslednje vreme i

na ljudima ukazuju na ulogu i korisnost primene KIM-1 kao neinvazivnog, osetljivog i specifičnog biomarkera oštećenja bubrega (105-107). Brojne karakteristike KIM-1 pokazuju da bi ovaj protein mogao biti idealan biomarker bubrežne funkcije:

- odsustvo ekspresije KIM-1 na nivou normalnog bubrežnog tkiva;
- izrazita ushodna regulacija i inkorporacija u apikalnu membranu proksimalnih tubula u slučaju oštećenja bubrežnog tkiva;
- prisustvo u epitelnim ćelijama bubrega sve dok se ćelije u potpunosti ne oporave;
- brzo i značajno cepanje ekstracelularnog domena KIM-1 i njegovo izlučivanje urinom tokom oštećenja bubrega;
- stabilnost ekstracelularnog domena KIM-1 u urinu na sobnoj temperaturi, (94).

Kako bi se procenila korisnost KIM-1 kao biomarkera, najpre su analizirana tkiva eksperimentalnih životinja i urinarna ekskrecija u odgovoru na tri različita tipa nefrotoksina: S-(1,1,2,2-tetrafluoroetil)-L-cistein (TFEC), folnu kiselinu i cisplatin (105). Izrazito povećanje KIM-1 ekspresije potvrđena su imunoblot analizom kod sva tri modela. Ushodna regulacija ekspresije KIM-1 i njegovo prisustvo u urinu u odgovoru na izloženost različitim tipovima nefrotoksina upućuje na to da ovaj protein može da služi kao opšti biomarker za oštećenje tubula i procese oporavka. Budući da je utvrđeno da ponašanje KIM-1 kod životinja potpuno odražava njegovo ponašanje kod ljudi, jasno je da će ovaj biomarker u budućnosti imati veliki značaj u razvoju lekova kao pokazatelj nefrotoksičnosti. Američka i evropska agencija za kontrolu lekova su uvrstile KIM-1 u malobrojnu listu biomarkera AOB koji će se određivati tokom razvoja novih lekova (108). Međutim, da bi se testirala uloga i korisnost KIM-1 kao markera tubularnog oštećenja kod ljudi u različitim kliničkim stanjima, rađene su odgovarajuće studije u cilju utvrđivanja ekspresije KIM-1 na uzorcima tkiva bubrega i urinarna ekskrecija kod pacijenata sa različitim akutnim i hroničnim bolestima bubrega (97, 109). Rezultati dobijeni ovim ispitivanjem pokazuju da postoji ekspresija KIM-1 na apikalnoj membrani epitelnih ćelija proksimalnih tubula kod pacijenata sa akutnom tubularnom nekrozom (ATN) bez obzira na njen uzrok. U niskoj koncentraciji KIM-1 je prisutan u urinu kod osoba bez AOB i HBB. Mada uzorci urina kod pacijenata sa neishemičnom etiologijom ATN ili različitim HBB imaju više koncentracije KIM-1 u odnosu na one koje su nađene kod osoba bez bubrežnih

bolesti, koncentracije KIM-1 su znatno više u urinu kod pacijenata sa ishemičnom ATN (97). Takođe, koncentracija KIM-1 u urinu odražava nivo KIM-1 u samom bubrežnom tkivu i pokazuje značajnu korelaciju sa renalnom fibrozom i inflamacijom (109).

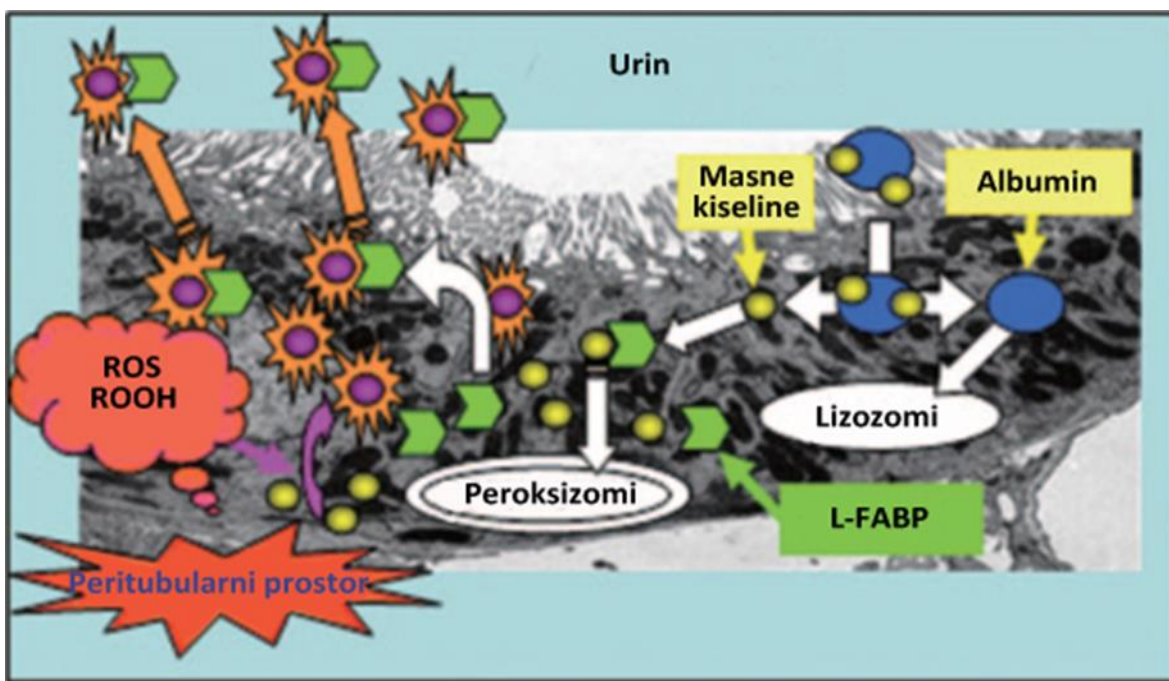
Dakle, KIM-1 ima jasnu ulogu u budućnosti i od velikog značaja će biti dalje istraživanje njegove uloge kod AOB i HBB, jer to može da dovede do njegove primene ne samo kao biomarkera nego i kao terapijskog cilja.

#### ***1.1.5.4. Jetreni tip vezujućeg proteina za masne kiseline***

Vezujući proteini za masne kiseline [*fatty acid binding proteins* (FABPs)] čine familiju proteina nosača za masne kiseline i druge lipofilne supstance, kao što su eikozanoidi i retinoidi, čime olakšavaju njihov transport između ekstra i intracelularnih membrana. Devet različitih proteina čine familiju FABPs, a oni imaju tkivno specifičnu raspodelu koja uključuje: jetru (*liver-L*), creva (*intestinal-I*), mišiće i srce (*muscle and heart-H*), adipocite (*adipocyte-A*), epiderm (*epidermal-E*), ileum (*ileal-II*), mozak (*brain-B*), mijelin (*myelin-M*) i testise (*testis-T*) (110). Struktura svih proteina koji čine familiju FABPs je slična, osnovni motiv koji karakteriše ove proteine je  $\beta$ -presavijena ploča i jedan ligand (masna kiselina, holesterol, retinoid) vezan u vodom ispunjenoj šupljini u unutrašnjosti molekule. Uprkos velikoj različitosti u sekvenci proteina, struktura gena je identična. FABPs geni se sastoje od 4 egzona i 3 introna, a neki od njih se nalaze u istom regionu hromozoma (110).

L-FABP je prevashodno prisutan u citoplazmi ćelija proksimalnih tubula bubrega, segmentu nefrona koji kao osnovni izvor za stvaranje energije koristi masne kiseline (111). Genska ekspresija L-FABP na nivou bubrega je ushodno regulisana, a urinarna ekskrecija L-FABP je povećana u različitim kliničkim stanjima: kod pojačanog izlučivanja proteina urinom, tubularne ishemije, istezanja zida tubula, hiperglikemije, i dejstva toksina koji uzrokuju oštećenje tubulointercijuma (112-115). Tokom oštećenja tkiva usled hipoksije, L-FABP vezuje oksidacione proizvode masnih kiselina i time ograničava njihove toksične efekte na nivou ćelijskih membrana. Transportovanjem ovih oksidacionih proizvoda do mitohondrija ili peroksizoma, L-FABP je uključen u homeostazu intracelularnih masnih

kiselina (111). Takođe, L-FABP je vrlo efikasan endogeni antioksidans. Zaštitni mehanizam L-FABP u oksidativnom stresu je verovatno posledica njegove veoma povoljne proteinske strukture u redoks uslovima, koja mu omogućava da inhibira ili vezuje intracelularne reaktivne radikale kiseonika, kao što su vodonik peroksid, superoksid, peroksidi lipida (111). Inače u fiziološkim uslovima na nivou bubrega, albumin se u kompleksu sa slobodnim masnim kiselinama filtrira u glomerulima, a potom reapsorbuje u proksimalnim tubulima. Posle reapsorpcije albumin se u citozolu prenosi do lizozoma, a masne kiseline oslobađaju i vezuju za L-FABP. Masne kiseline vezane za L-FABP se potom prenose do peroksizoma kako bi se smanjila njihova veličina. Međutim, u ishemijskim uslovima proizvodi lipidne peroksidacije se akumuliraju u proksimalnim tubulima i mogu izazvati njihovo oštećenje. L-FABP vezuje ove štetne proizvode lipidne peroksidacije i izlučuje ih urinom, (slika 5).



**Slika 5:** Uloga L-FABP kao antioksidansa u proksimalnim tubulima bubrega  
(*modifikovano prema referenci broj 111*)

Studija Wang i sar. je dokazala značaj L-FABP u smanjenju oksidativnog stresa tokom hipoksije u *in vitro* uslovima (116). Povećanjem ekspresije L-FABP, nivo intracelularnog oksidativnog stresa je bio umanjen. Na ovaj način je dokazano da L-FABP ne učestvuju samo u transportu masnih kiselina, već služi i kao rani pokazatelj ishemijskog stanja i važan je zaštitni ćelijski antioksidans koji inaktivira reaktivne oksidacione produkte lipida.

Na osnovu toga u poslednje vreme se dosta ispituje primena L-FABP kao biomarkera za ranu dijagnozu AOB. Kod miševa je merena koncentracija L-FABP u urinu (uL-FABP) u dva eksperimentalna modela AOB (ishemijskom tipu i cisplatinom indukovanom AOB), gde je u oba slučaja L-FABP bio povećan u urinu pre povećanja BUN (115). Takođe u oba modela AOB, uL-FABP je pokazao bolju korelaciju sa histološkim nalazima i GFR, nego BUN i urinarna N-acetil-D-glukozaminidaza. Ispitivanja na ljudima su takođe pokazala da je nivo ekspresije L-FABP u bubrezima i njegovo izlučivanje urinom u značajnoj korelaciji sa stepenom tubulointercijalnog oštećenja, infiltracijom makrofaga i taloženjem kolagena tip I (117). Dakle, AOB izaziva ushodnu regulaciju renalne ekspresije L-FABP i pojačano izlučivanje L-FABP iz proksimalnih tubula putem urina. Pošto je ekspresija L-FABP posebno izražena na nivou proksimalnih tubula, segmentu nefrona sa veoma visokim energetske potrebama, njegova urinarna ekskrecija se povećava usled ishemije (118, 119). Tokom kardiohirurških intervencija nakon primene CPB usled ishemije koja zahvata tubulointercijum dolazi do razvoja AOB. Merenjem koncentracije uL-FABP kod pedijatrijskih pacijenata pre i posle kardiohirurške intevencije sa primenom CPB utvrđeno je višestruko povećanje koncentracije uL-FABP ubrzo nakon operacije kod pacijenata koji su razvili AOB (120). Vreme primene CPB i koncentracija uL-FABP su bili nezavisni faktori rizika za razvoj AOB. Ova studija je pokazala da L-FABP predstavlja osetljiv rani biomarker AOB u oblasti kardiohirurgije.

#### **1.1.6. Oksidativni stres i AOB kod dece sa IUT**

Oksidativni stres nastaje kao posledica poremećaja ravnoteže između sadržaja slobodnih radikala i antioksidanasa u korist slobodnih radikala, usled čega dolazi do

oštećenja vitalnih ćelijskih makromolekula (121). Oksidativni stres kao stanje disbalansa između prooksidantnih i antioksidantnih procesa u organizmu može biti kako uzrok, tako i posledica velikog broja bolesti. Određivanje nivoa oksidativnog stresa u organizmu, kao i kapaciteta sistema antioksidativne zaštite, može biti izuzetno važno za unapređenje zdravlja kako pojedinaca, tako i opšte populacije.

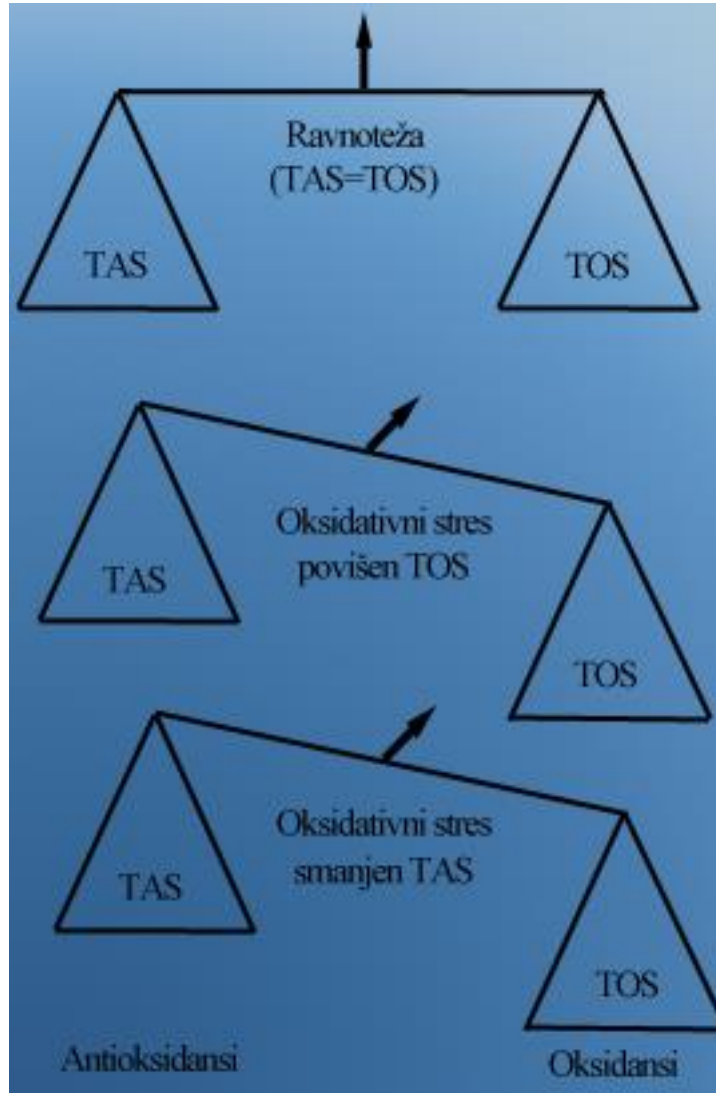
Danas je dobro poznato da oksidativni stres ima važnu ulogu u patogenezi bolesti bubrega. Bubrezi su izuzetno osetljivi na oštećenje izazvano kiseoničnim radikalima, najverovatnije zbog velike količine dugolančanih, polinezasićenih masnih kiselina koje se nalaze u sastavu lipida bubrega (121). IUT izaziva oksidativni stres i dovodi do supresije antioksidantnih enzima (122). Oksidativno oštećenje bubrega tokom IUT nastaje od kiseoničnih radikala koje stvaraju aktivirane inflamatorne ćelije infiltrirane u glomerule (123). Polimorfonuklearni leukociti, koji su inače glavni ograničavajući faktor za rast bakterija u urinarnom traktu, takođe mogu biti odgovorni i za oštećenja tkiva (124). Sa daljim napredovanjem infekcije, bakterije razlažu kolagen i ostale komponente ekstracelularnog matriksa, pojačavajući tako glomerularno i mezengijalno oštećenje (125). Takođe, u zavisnosti od inteziteta inflamacije, otpuštanje citokina i proteolitičkih enzima iz leukocita može da inicira stvaranje ožiljnog tkiva i renalnu fibrozu, a na kraju da dovede i do insuficijencije bubrega (126, 127).

Zbog izrazite nestabilnosti slobodnih radikala klinička ispitivanja oksidativnog stresa su bazirana na merenju različitih stabilnih oksidacionih produkata i antioksidativnih supstanci. Koncentracije različitih oksidanasa i antioksidanasa se mogu meriti odvojeno u serumu, ali su merenja u tom slučaju dugotrajna, zahtevaju sveobuhvatno angažovanje laboratorijskog osoblja i primenu komplikovanih tehnika. Shodno tome, razvijene su mnoge metode koje mere ukupni prooksidantni i antioksidanti kapacitet.

Prooksidansi nastaju konstantno u humanom organizmu kao proizvodi različitih fizioloških procesa. To su nestabilni molekuli velike reaktivnosti, koji u organizmu stupaju u hemijske reakcije sa delovima ćelije pri čemu dovode do biohemijskih, strukturnih, funkcionalnih poremećaja. Pošto je efekat različitih oksidanasa u serumu aditivan, primenom Erel-ove metode može se odrediti ukupan kapacitet svih pojedinačnih

oksidanasa u organizmu koji se naziva totalni oksidativni status (TOS) (128). Glavne komponente TOS u serumu su vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) i lipidni hidroperoksidi.

Pored oksidacionih procesa, u zdravom organizmu neprestano funkcioniše fiziološki proces antioksidativne zaštite koji ima za cilj da spreči štetno delovanje prooksidativnih faktora. Odnos oksidacionih procesa i procesa antioksidacione zaštite u organizmu predstavljen je na slici 6.



**Slika 6:** Odnos oksidacionih procesa i procesa antioksidacione zaštite u organizmu

Antioksidansi su supstance koje dovode do odlaganja ili inhibicije oksidacije supstrata. Sistem antioksidativne zaštite deluje na više nivoa, a obuhvata enzimske i

neenzimske antioksidanse. Kao prvi nivo odbrane, ovaj sistem uključuje enzime, uglavnom intracelularno locirane kao što su superoksid-dismutaza, glutation-peroksidaza, glutation-reduktaza i katalaza. Osim enzima, sistem antioksidativne zaštite sadrži i makromolekule (albumin, ceruloplazmin i feritin), kao i nekoliko malih molekula antioksidanasa koji su prisutni intra- i ekstra-celularno (redukovani glutation, ubihinon Q10, ureja, bilirubin, metionin i vitamini - askorbinska kiselina,  $\alpha$ -tokoferol i  $\beta$ -karoten) i nekoliko mikroelemenata (129). Efekat različitih antioksidanasa u serumu je takođe aditivan. Totalni antioksidativni status (TAS) predstavlja ukupni antioksidativni kapacitet, odnosno nivo svih antioksidanasa u organizmu, a takođe se može meriti Erel-ovom metodom (130). Primenom Erel-ove metode određene antioksidativne molekule (proteini, mokraćna kiselina, vitamin C, bilirubin, vitamin E) su izdvojene kao najvažnije s obzirom na njihovu koncentraciju u serumu. Za svaku od pomenutih antioksidantnih komponenti seruma poznata je relativna aktivnost i procentualni doprinos kojim učestvuje u totalnom antioksidativnom kapacitetu, (tabela 5), (130).

**Tabela 5.** Procentualni doprinos antioksidativnih komponenti seruma TAS

<b>Antioksidativne komponente seruma</b>	<b>Relativna aktivnost</b>	<b>Koncentracija u serumu (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>Doprinos TAS (mmol Troloks ekvivalenta/L)</b>	<b>Doprinos TAS (%)</b>
<b>SH grupe proteina</b>	2,20	303 – 525	0,91	52,9
<b>Mokraćna kiselina</b>	1,85	150 – 470	0,57	33,1
<b>Vitamin C</b>	1,35	28 – 85	0,08	4,7
<b>Bilirubin</b>	3,80	3 – 17	0,04	2,4
<b>Vitamin E</b>	1,00	12 – 45	0,03	1,7
<b>Ostali</b>	-	-	0,09	5,2
<b>Ukupno</b>	-	-	1,72	100

*Tabela modifikovana prema referenci broj 130*



Analiza TOS i TAS u krvi predstavlja neinvazivan i jednostavan način procene oksidativnog statusa organizma. Parametri koji određuju ukupan sadržaj oksidanasa i antioksidanasa mogu biti posebno korisni u pedijatriji, u kojoj se često raspoložuje malom količinom uzoraka.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

AOB se uglavnom razvija bez specifičnih simptoma, a postavljanje dijagnoze ovog sve učestalijeg poremećaja i dalje zavisi od određivanja serumskog kreatinina, koji je nepouzdan marker akutnih promena u funkciji bubrega zbog sporog odgovora u odnosu na oštećenje epitelnih ćelija tubula bubrega i činjenice da mnoge varijable mogu uticati na koncentraciju kreatinina. Kako je etiologija AOB heterogena, uvođenje novih biomarkera za ranu detekciju AOB predstavlja veliki izazov, jer nijedan od novih AOB biomarkera nije sistematski procenjen u različitim kliničkim stanjima.

Mogući uzrok za razvoj AOB je i teži oblik IUT, pogotovu kod dece jer u prve dve godine života bubrežna funkcija fiziološki sazreva. Aktuelna dijagnostička procedura za praćenje zahvaćenosti bubrega tokom IUT, scintigrafija bubrega je invazivna i skupa dijagnostička tehnika. Zbog svega toga neophodno je razmotriti nove parametare i neinvazivne metode u proceni stanja i ishoda oboljenja kod pedijatrijskih pacijenata sa dijagnozom IUT. Shodno tome, procenjeno je da li bi primena panela sačinjenog od dva biomarkera u cilju rane dijagnoze AOB (KIM-1) i predikcije jakog, dugotrajnog zapaljenskog procesa (NGAL) mogla unaprediti procenu toka i ishoda bolesti kod dece sa IUT. Pored toga, danas je dobro poznato da oksidativni stres ima važnu ulogu u patogenezi bolesti bubrega. Zbog toga je u studiju uključeno i određivanje parametara TAS i TOS, kako bi se na jednostavan način mogle pratiti promene u oksidativno-antioksidativnom balansu kod dece sa IUT.

Takođe, veoma su retke studije koje su ispitivale finansijsku opravdanost određivanja biomarkera za ranu dijagnozu AOB u rutinskim laboratorijama. Imajući u vidu visoku incidencu AOB kod dece nakon kardiohirurških intervencija, ali i najveću ispitanost novih biomarkera AOB upravo u ovoj etiologiji, u ekonomskoj studiji akcenat je stavljen na strategiju ispravno postavljene dijagnoze AOB različitim dijagnostičkim procedurama sa najmanjim utroškom finansijskih sredstava. Perspektiva ekonomske studije se sastoji u definisanju efikasnog, bezbednog i ekonomičnog dijagnostičkog pristupa pedijatrijskim pacijentima sa AOB nakon kardiohirurških intervencija kako bi se smanjio broj smrtnih ishoda i hroničnih komplikacija, a sa druge strane uštedela znatna finansijska sredstva.

Na osnovu svega navedenog postavljeni su sledeći ciljevi:

- 1) Ispitati promene biomarkera bubrežne funkcije: KIM-1, uNGAL i sNGAL u odnosu na stanje infekcije i razvoj AOB kod dece sa IUT.
- 2) Ispitati dijagnostičku tačnost ovih parametara u skriningu razvoja AOB i dužine trajanja inflamacije kod dece sa IUT.
- 3) Utvrditi ukupan prooksidantni i antioksidativni kapacitet dece sa IUT merenjem parametara TOS i TAS i računanjem indeksa oksidativnog stresa (OSI), kao i njihove promene u skladu sa stanjem akutne inflamacije i razvojem AOB.
- 4) Uraditi ekonomsku procenu efektivnosti primene različitih AOB biomarkera: uNGAL, uL-FABP i Cys-C u serumu (sCys-C) u odnosu na aktuelnu dijagnostičku metodu (merenje koncentracije kreatinina u serumu) kod dece u kardiohirurgiji.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Biomarkeri AOB i parametri oksidativnog statusa kod dece sa IUT**

##### **3.1.1. Dizajn studije i ispitanici**

U periodu od godinu dana (od januara do decembra 2011. godine) sprovedena je prospektivna centralizovana studija na odeljenju nefrologije u bolnici Univerzitetske dečije klinike u Beogradu. Pedeset pacijenata kojima je na prijemu u bolnicu dijagnostikovana prva febrilna IUT bilo je uključeno u ovu studiju. Ispitivanje, lečenje i dalje praćenje dece je sprovedeno u skladu sa protokolima bolnice. Sledeći demografski podaci su zabeleženi: pol, starost, visina, težina, telesna temperatura, trajanje povišene telesne temperature, broj dana provedenih u bolnici, uzročnik infekcije i primenjena terapija. Pacijenti koji su ispunjavali sledeće kriterijume su uključeni u studiju: temperatura viša od 38,5°C bez drugog prepoznatljivog uzroka, leukocitoza (broj leukocita viši od referentnih vrednosti za dati uzrast deteta), koncentracija CRP viša od 20 mg/L, pozitivno test polje za leukocitnu esterazu na urin traci i/ili piurija (sediment urina:  $\geq 10$  leukocita). IUT je dijagnostikovana ukoliko je utvrđena klinički značajna bakteriurija ( $>100000$  kolonija po mL urina) u nalazu urinokulture. Sva deca su u roku od 48h od prijema u bolnicu podvrgnuta ultrazvučnom pregledu abdomena i urinarnog trakta, dok cistouretrografija nije bila obavezna, već je sprovedena samo na zahtev lekara i uz saglasnost roditelja. Deca kod kojih su utvrđene anorektalne ili urogenitalne anomalije, ili pak neurološke bolesti nisu uključena u ovu studiju. Kriterijumi za otpust pacijenata iz bolnice su bazirani na kliničkoj proceni odgovora na primenjenu terapiju antibioticima (telesna temperatura, broj leukocita i koncentracija CRP u krvi, broj leukocita u urinu i nalaz urinokulture).

Klasifikacija pacijenata je sprovedena na dva načina: prema proceni funkcije bubrega i trajanja inflamacije tokom IUT. Procena bubrežne funkcije je izvršena na osnovu izračunate vrednosti GFR primenom Schwartz-ove formule (14). Podela pacijenata u grupe na osnovu razvoja AOB (sa AOB i bez AOB) vršena je prema smanjenju vrednosti GFR za više od 25% u odnosu na referentne vrednosti za dati uzrast (131). U drugoj klasifikaciji,

pacijenti su podeljeni prema CRP vrednostima dobijenim pri otpustu iz bolnice. Smatra se da koncentracija CRP  $\geq 10$  mg/L ukazuje na klinički relevantno inflamatorno stanje (132). U ovoj studiji visoke CRP vrednosti pri otpustu iz bolnice označavaju IUT u remisiji, ali sa produženim trajanjem inflamacije. Shodno tome, formirane su dve grupe: pacijenti sa koncentracijom CRP većom od 10 mg/L pri otpustu iz bolnice su označeni kao pacijenti sa dužim trajanjem inflamacije (kodirani sa 1), dok su pacijenti sa koncentracijom CRP manjom od 10 mg/L označeni kao pacijenti sa kraćim trajanjem inflamacije (kodirani sa 0).

Rutinske analize su urađene u biohemijsko-hematološkoj i mikrobiološkoj laboratoriji Univerzitetske dečije klinike u Beogradu. Biomarkeri AOB i parametri oksidativnog statusa su određeni na Katedri za medicinsku biohemiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Studija je sprovedena u skladu sa etičkim načelima Helsinške deklaracije i načelima Etičkog komiteta Univerzitetske dečije klinike u Beogradu (broj rešenja: 017/6-26/112) i Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj rešenja: 1169/29). U studiju su uključena deca čiji su roditelji ili staratelji dali pismenu saglasnost za učestvovanje u istraživanju.

### **3.1.2. Uzorkovanje krvi i urina**

Za svakog pacijenta sakupljeni su uzorci krvi i urina, po prijemu u bolnicu i u vreme otpusta iz bolnice. Krv je vađena u vakuum epruvete bez aditiva za biohemijske analize (4 mL) i sa antikoagulansom K<sub>2</sub>-EDTA za određivanje broja leukocita (3 mL; Becton, Dickinson, and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Uzorci seruma su dobijeni centrifugiranjem krvi na 1200xg tokom 10 minuta, a korišćeni su za određivanje koncentracije markera inflamacije CRP, parametara bubrežne funkcije (ureje i kreatinina), biomarkera AOB (sNGAL), kao i parametara oksidativnog statusa (TAS i TOS). Uzorci urina prikupljeni su tehnikom srednjeg mlaza ili primenom sterilnih kesica. Jedan deo urina je korišćen za hemijsku analizu i mikroskopsko ispitivanje sedimenta urina, kao i za određivanje koncentracije biomarkera AOB (uNGAL i KIM-1), a drugi deo za mikrobiološka ispitivanja. Uzorci urina su centrifugirani pri temperaturi od 4°C tokom 15

minuta na 13000xg. Alikvoti seruma i urina su čuvani na -80°C za određivanje biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa, a svi ostali testovi su izvođeni odmah.

### **3.1.3. Metode određivanja biohemijskih parametara**

Koncentracije kreatinina i ureje su određene primenom rutinskih metoda (Olympus System Reagents–Olympus analyser AU 2700, Hamburg, Germany), dok je koncentracija CRP određena nefelometrijskom metodom (Siemens C-reactive protein assay–Dimension RxL Max Integrated Chemistry System, Erlangen, Germany).

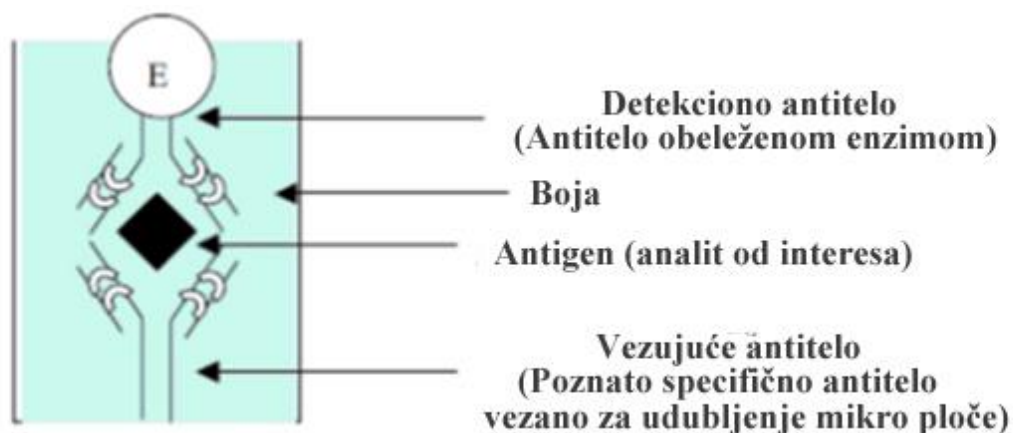
#### **3.1.3.1. Određivanje biomarkera AOB – ELISA metoda**

Koncentracije sNGAL, uNGAL I KIM-1 su merene primenom enzimskih imuno testova [*enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA)] (R&D Systems Europe, Abingdon, United Kingdom). Uzorci urina za određivanje uNGAL su razblaženi u odnosu 1:60, dok su uzorci seruma za sNGAL razblaženi u odnosu 1:40. Uzorci urina za određivanje KIM-1 nisu razblaživani. Koncentracije NGAL i KIM-1 su izražene u nanogramima po mililitru (ng/mL).

##### **3.1.3.1.a Princip ELISA metode**

ELISA metoda se zasniva na principu “sendvič” antitelo, u kojoj se poliklonalna kozija anti–humana antitela specifična za analit od interesa (antigen) vezuju za mikro titarsku ploču i čine čvrstu fazu (slika 7). Tokom perioda inkubacije analit iz uzoraka i standarda gradi kompleks sa vezujućim antitelima, a potom podleže i konjugaciji sa detekcionim antitelima obeleženim biotinom. Detekciona antitela se vezuju za različite epitope na molekulu antigena gradeći tako “sendvič”. Potom se preko biotina gradi kompleks sa detekcionim reagensom peroksidazom rena konjugovanom sa streptavidinom [*streptavidin-horseradish-peroxidase* (HRP)]. Pod dejstvom peroksidaze razlaže se

3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supstrat, a intezitet razvijene boje je proporcionalan količini vezanog analita.



Slika 7: Princip ELISA metode

#### 3.1.3.1.b Materijal potreban za izvođenje ELISA metode

- **Vezujuća antitela** – Liofilizat kozijih anti-humanih antitela (koncentracije 72 µg/mL za KIM-1; 360 µg/mL za NGAL) rekonstituisan je sa 1 mL fosfatnog pufera [*Phosphate-buffered saline* (PBS)], i razblažen je sa PBS do radnih koncentracija (0,4 µg/mL za KIM-1; 2,0 µg/mL za NGAL).
- **Detekciona antitela** - Liofilizat biotinom obeleženih kozijih anti-humanih antitela (koncentracije 72 µg/mL za KIM-1; 18 µg/mL za NGAL) rekonstituisan je sa 1 mL reagens diluenta i razblažen je sa reagens diluentom do radnih koncentracija (400 ng/mL za KIM-1; 100 ng/mL za NGAL).
- **Standard** - Liofilizat rekombinantnog humanog KIM-1 i NGAL (koncentracije 105 ng/mL za KIM-1; 90 ng/mL za NGAL) rekonstituisan je sa 0,5 mL reagens diluenta i razblažen je sa reagens diluentom do radnih koncentracija (2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,25 pg/mL za KIM-1; 2 ng/mL, 1 ng/mL, 0,5 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,125 ng/mL, 0,0625 ng/mL za NGAL).

- **Streptavidin-HRP** –1 mL Streptavidin-HRP razblažen je sa reagens diluentom do radne koncentracije koja je naznačena na bočici.
- **Fosfatni pufer u fiziološkom rastvoru** [*phosphate buffer saline (PBS)*] - 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2 – 7,4; 0,2 μm filtriranje.
- **Pufer za ispiranje** – 0,05% Tween 20 u PBS-u; pH 7,2 – 7,4.
- **Reagens diluent** - 1% goveđi serumski albumin u PBS-u; pH 7,2 – 7,4; 0,2 μm filtriranje.
- **Supstrat reagens** - mešavina kolor reagensa A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i kolor reagensa B (TMB) u odnosu 1:1.
- **Stop reagens** - 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### ***3.1.3.1.c Postupak izvođenja ELISA metode***

#### Priprema ploče

- 1) U ploče je odmereno po 100 μL radnog rastvora koji sadrži vezujuća antitela. ELISA ploča je prekrivena folijom i inkubirana preko noći na tamnom na sobnoj temperaturi.
- 2) Svaki bazenčić je aspiriran, a nakon toga je dodat pufer za ispiranje (400 μL po bazenčiću). Ispiranje je ponavljano najmanje tri puta. Nakon ispiranja, ostatak pufera je uklonjen iz bazenčića aspiracijom i okretanjem ploče na čist papir za upijanje.
- 3) U svaki bazenčić dodato je po 300 μL reagens diluenta. Inkubiranje je vršeno na sobnoj temperaturi najmanje 1h.
- 4) Aspiracija/ispiranje je ponovljeno kao u koraku 2 nakon čega je ELISA ploča spremna za dodavanje uzorka.



### Test procedura

- 1) Dodato je po 100  $\mu$ L uzorka ili standarda i lagano mešano oko 1 minut. Ploče su prekrivene folijom i inkubirane 2h na sobnoj temperaturi.
- 2) Aspiracija/ispiranje je ponovljeno kao u koraku 2 pripreme ploče.
- 3) Dodato je po 100  $\mu$ L rastvora koji sadrži detekciona antitela. Ploče su prekrivene folijom i inkubirane 2h na sobnoj temperaturi.
- 4) Aspiracija/ispiranje je ponovljeno kao u koraku 2 pripreme ploče.
- 5) Dodato je po 100  $\mu$ L Streptavidin-HRP radnog rastvora. Ploče su prekrivene folijom i inkubirane 20 minuta na sobnoj temperaturi.
- 6) Aspiracija/ispiranje je ponovljeno kao u koraku 2 pripreme ploče.
- 7) Dodato je po 100  $\mu$ L rastvora supstrata. Ploče su inkubirane 20 minuta na sobnoj temperaturi.
- 8) Dodato je po 50  $\mu$ L stop reagensa. Blagim lupkanjem ploče o podlogu obezbeđeno je dobro mešanje sadržaja bazenčića.
- 9) Apsorbancija je izmerena na talasnoj dužini od 450 nm za KIM-1 i NGAL.

### **3.1.3.2. Određivanje parametara oksidativnog statusa**

Za određivanje parametara oksidativnog statusa (TAS i TOS) primenjene su nove spektrofotometrijske metode koje je formulisao Erel (128, 130). Urađena je modifikacija Erel-ove metode i aplikacija na analizatoru (ILab 300 Plus analyzer Instrumentation Laboratory, Milan, Italy). Apsorbancije uzoraka su merene na talasnim dužinama od 620 nm za TAS i 546 nm za TOS.

#### **3.1.3.2.a Princip metode za određivanje TOS u serumu**

TOS je određivan primenom kolorimetrijske metode koju je formulisao Erel (128). Ova metoda se bazira na oksidaciji fero jon–orto-dianizidnog kompleksa u feri jon u prisustvu oksidanasa iz uzorka. Reakcija oksidacije olakšana je molekulom glicerola koji je prisutan u reakcionom medijumu. Nastali feri jon zatim gradi obojeni kompleks sa ksilenol-

oranžom u kiseloj sredini. Kao standard je korišćen vodeni rastvor  $H_2O_2$  opsega koncentracije 10-200  $\mu\text{mol/L}$ , što odgovara linearnosti metode i očekivanim koncentracijama u biološkom materijalu. Dobijeni rezultati su izraženi u  $\mu\text{mol } H_2O_2$  ekvivalenta na litar ( $\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ Equiv./L}$ ).

❖ **Reagensi za određivanje TOS**

- **Reagens 1: TOS 1** - Pripremljen je rastvaranjem ksilenol-oranža (114 mg) i NaCl (8,18 g) u 900 mL rastvora  $H_2SO_4$  ( $c=25 \text{ mM}$ ). U tako dobijeni rastvor dodato je 100 mL glicerola. pH vrednost ovog reagensa je podešena na 1,75.
- **Reagens 2: TOS 2** - Pripremljen je rastvaranjem feroamonijum sulfata (1,96 g) i o-dianizidin dihidrohlorida (3,17 g) u 1000 mL rastvora  $H_2SO_4$  ( $c=25 \text{ mM}$ ).

**3.1.3.2.b Princip metode za određivanje TAS u serumu**

Za određivanje TAS korišćena je spektrofotometrijska metoda koju je formulisao Erel (130). Ova metoda se bazira na redukciji i obezbojavanju 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat)-radikalskog katjona ( $ABTS^+$ ) kao hromogena sa antioksidansima prisutnim u uzorku seruma. Sam rastvor ABTS-a je bezbojan, ali oksidacijom do  $ABTS^+$  pomoću  $H_2O_2$  u kiselom medijumu (acetatni pufer;  $pH=3,6$ ) rastvor dobija karakterističnu smaragdnu boju. Kada se obojeni  $ABTS^+$  pomeša sa nekom supstancom koja može da se oksiduje (antioksidans), redukuje se do bezbojnog ABTS-a što se manifestuje promenom boje odnosno obezbojavanjem ispitivanog rastvora. Smanjenje apsorbancije, odnosno intenzitet obezbojavanja rastvora srazmeran je koncentraciji prisutnih ukupnih antioksidanasa u uzorku. Koncentracija prisutnih antioksidanasa u uzorku određena je upotrebom standardne krive. Standard korišćen za određivanje TAS je 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), hidrosolubilni ekvivalent vitamina E. Kako se on teško rastvara u vodi za pripremu rastvora primenjen je 30 mmol/L fosfatni pufer,  $pH=7,4$ . Pri konstruisanju standardne krive korišćeni su rastvori Trolox-a rastućih koncentracija i to: 0,125 mmol/L; 0,25 mmol/L; 0,5 mmol/L; 0,75

mmol/L; 1 mmol/L; 1,5 mmol/L; 2 mmol/L, što je ujedno i gornja granica linearnosti metode. Dobijeni rezultati su izražavani se u mmol Trolox ekvivalenta na litar (mmol Trolox Equiv./L).

❖ **Reagensi za određivanje TAS**

- **Reagens 1: Acetatni pufer (pH = 5,8; 0,4 mol/L)** - Priprema se mešanjem 940 mL CH<sub>3</sub>COONa (0,4 mol/L) i 60 mL CH<sub>3</sub>COOH (0,4 mol/L) za 1000 mL rastvora (prvo se dodaje bazna komponenta, a potom kiselina dok se ne postigne potrebna pH vrednost). Rastvor pufera je stabilan 6 meseci na temperaturi od +4°C.
- **Reagens 2: Rastvor ABTS-a [2,2-azobis (3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat)]** - Priprema se mešanjem 30 mL acetatnog pufera (pH=3,6; 30 mmol/L), 70 mL rastvora H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mmol/L). Potom se 0,549 g čvrstog ABTS-a rastvori u 100 mL prethodno pripremljenog rastvora (finalna koncentracija rastvora ABTS-a je 10 mmol/L). Inkubira se 1h na sobnoj temperaturi, dok rastvor ne poprimi karakterističnu intenzivnu plavo-zelenu boju ABTS<sup>+</sup>. Ovako pripremljen reagens je stabilan 6 meseci na 4°C.
- **Reagens 3: Rastvor Troloksa** - Kao standard se koristi hidrosolubilni analog vitamina E – Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina, Mr=250,29 g/mol). Rastvor Troloksa se priprema rastvaranjem u fosfatnom puferu, pH=7,4; 30 mmol/L.

**3.1.3.3. Računska operacija za određivanje OSI**

Odnos TOS i TAS se označava kao OSI (133). Kako bi se izvela računica, jedinice TAS, mmol Trolox equiv./L, su promenjene u μmol Trolox equiv./L, i OSI vrednost je izračunata na sledeći način:

$$\text{OSI (arbitrary unit (AU))} = \frac{\frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv.}}{\text{L}}}{\frac{\text{TAS, } \mu\text{mol Trolox Equiv}}{\text{L}}}$$
$$100$$

### 3.1.4. Statistička analiza

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

Da bi se utvrdilo da li su podaci distribuirani po normalnoj raspodeli korišćen je Shapiro-Wilk test. Za analizu kontinuiranih promenljivih između ispitanika tokom prijema i u vreme otpusta iz bolnice (dve tačke merenja), koje su distribuirane po normalnoj raspodeli, upotrebljen je Student-t test za dva zavisna uzorka. Efekti inflamacije i AOB na varijable u serumu i urinu u vreme otpusta iz bolnice ispitani su Student-t testom za dva nezavisna uzorka i analizom kovarijanse [*Analysis of covariance* (ANCOVA)] uz korekciju za bazalne vrednosti (vrednosti u trenutku prijema u bolnicu). Pored toga, promene u ispitivanim varijablama su analizirane korišćenjem dvofaktorske analize varijanse [*Analysis of variance* (ANOVA)] sa ponavljanjem, gde su kao faktori korišćeni vreme prijema i otpusta pacijenata iz bolnice i razvoj AOB. Podaci koji nisu distribuirani po normalnoj raspodeli analizirani su primenom neparametarskog Wilcoxon signed-rank testa za dva zavisna uzorka ili Mann-Whitney testa za dva nezavisna uzorka.

Interindividualna i intraindividualna varijabilnost je računata u grupama ispitanika formiranim na osnovu starosti pacijenata. Koeficijent varijacije (Kv) između subjekata (interindividualna varijabilnost) za svaki parametar je izračunata u vreme prijema i otpusta iz bolnice. Intraindividualna varijabilnost je izražena kao korelacija između vrednosti za svaki parametar u trenutku prijema u bolnicu i vrednosti istog parametra u vreme otpusta iz bolnice, računanjem Spearman-ovog koeficijenta korelacije.

Dijagnostička tačnost ispitivanih parametara je proverena ROC analizom. Parametri sa statistički značajnom tačnošću su dalje kombinovani sa drugim parametrima, a površine ispod krive AUCs za modele su izračunate pomoću C analize.

Podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija za normalno distribuirane kontinuirane varijable ili kao relativne i apsolutne frekvence za kategoričke varijable. Logaritamski-transformisane varijable izražene su kao geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti (IP) za srednju vrednost. Podaci koji nisu distribuirani po normalnoj raspodeli prikazani su kao medijana i inter-kvartilni opseg. Svi testovi su smatrani statistički značajnim za  $P < 0,05$ .

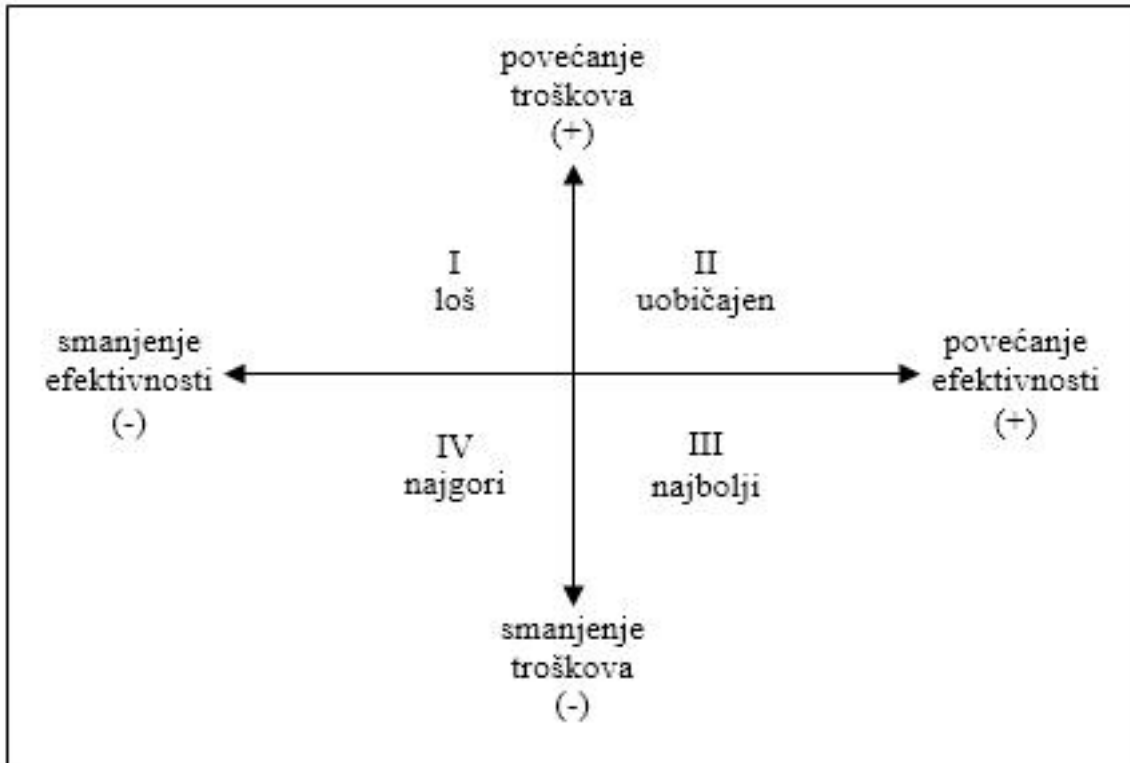
## **3.2. Ekonomska analiza primene biomarkera AOB kod dece u kardiohirurgiji**

Imajući u vidu jako visoku incidencu AOB nakon kardiohirurških intervencija kod dece sa visokom stopom smrtnosti, ali i najveći broj podataka za nove biomarkere AOB koji su najviše istraživani upravo u ovoj etiologiji, u ekonomskoj studiji akcenat je stavljen na strategiju ispravno postavljene dijagnoze AOB u kardiohirurgiji različitim dijagnostičkim procedurama sa najmanjim utroškom finansijskih sredstava.

### **3.2.1. Analiza odnosa troškova i efektivnosti**

U zdravstvu uglavnom postoji više od jednog pristupa u sprovođenju dijagnostike ili tretmana određenog oboljenja. Ti različiti pristupi ne samo da se razlikuju po efektivnosti, nego se razlikuju i po troškovima koje iziskuju. Farmakoeconomija treba da identifikuje, izmeri i proceni troškove i rezultate zdravstvene intervencije kada postoji više od jedne mogućnosti.

Analiza u kojoj se troškovi mere u odnosu na jedan isti rezultat, ali postizan različitim metodama naziva se analiza odnosa troškova i efektivnosti (TE) (134). Analiza TE je komparativna analiza troškova neophodnih za postizanje odgovarajućeg kliničkog efekta. Da bi se ova analiza izvela neophodno je uporediti troškove dve ili više strategija čiji je krajnji efekat izmeren istim pokazateljem.



**Slika 8:** Prikaz različitih kombinacija TE shodno promeni efektivnosti i troškova  
(modifikovano prema referenci broj 134)

Na slici 8 je prikazana veza između troškova i efektivnosti kod dve ispitivane procedure. Kvadrat I opisuje neprihvatljivu kombinaciju TE, jer povećanje troškova prati pad efektivnosti. Kvadrat II opisuje najuobičajeniju kombinaciju TE gde je povećanje efektivnosti praćeno povećanjem troškova, pri čemu se naravno teži minimalnom povećanju troškova a maksimalnom povećanju efektivnosti. Kvadrat III predstavlja najidealniju kombinaciju TE gde je povećanje efektivnosti povezano sa smanjenjem troškova. Kvadrat IV je najlošija kombinacija TE, jer smanjenje troškova dovodi do smanjenja efektivnosti, pa samim tim i najopasnija, zbog čega organizacije koje su odgovorne za finansiranje zdravstvenih ustanova moraju da vode računa da se zbog smanjenja troškova ne smanji i njihova efektivnost, (134).

Razlikuju se srednja i inkrementalna analiza TE. **Srednja analiza TE** predstavlja količnik ukupnih troškova i ukupnih efekata. **Inkrementalna analiza TE** poredi razliku troškova dve strategije, npr. dva laboratorijska testa ( $\Delta$ troškovi) i razlike njihove efektivnosti ( $\Delta$ efektivnost). Inkrementalni troškovi predstavljaju odnos  $\Delta$ troškovi/ $\Delta$ efektivnost i pokazuju koliko košta svaki dopunski efekat jedne efektivnije procedure u odnosu na ponuđenu alternativu sa manjim efektom (134). Jedan laboratorijski test će imati bolji odnos troškova i efektivnosti od drugog ako su ispunjeni neki od sledećih uslova:

- manje troškova za isti efekat (ušteta troškova za isti ishod),
- mnogo veća ušteta troškova, a samo mali gubitak u efektivnosti,
- malo veći troškovi, ali daleko veći efekat, (135).

### ***3.2.1.1. "Drvo odluke" i Markovljev model***

Analiza TE se može uraditi korišćenjem različitih ekonomskih modela, a odabir modela zavisi od vrste podataka o određenoj bolesti kojima raspolažemo. Za analizu TE često se koriste "drvo odluke" i Markovljev model. "Drvo odluke" se koristi za istraživanje svih verovatnih puteva i posledica koji se mogu pojaviti tokom vremena (53). Markovljev model se koristi za ekonomsku evaluaciju hroničnih bolesti u kojima se tretmani i zdravstvena stanja ponavljaju (136).

### ***3.2.1.2. Godine života prilagođene u odnosu na kvalitet***

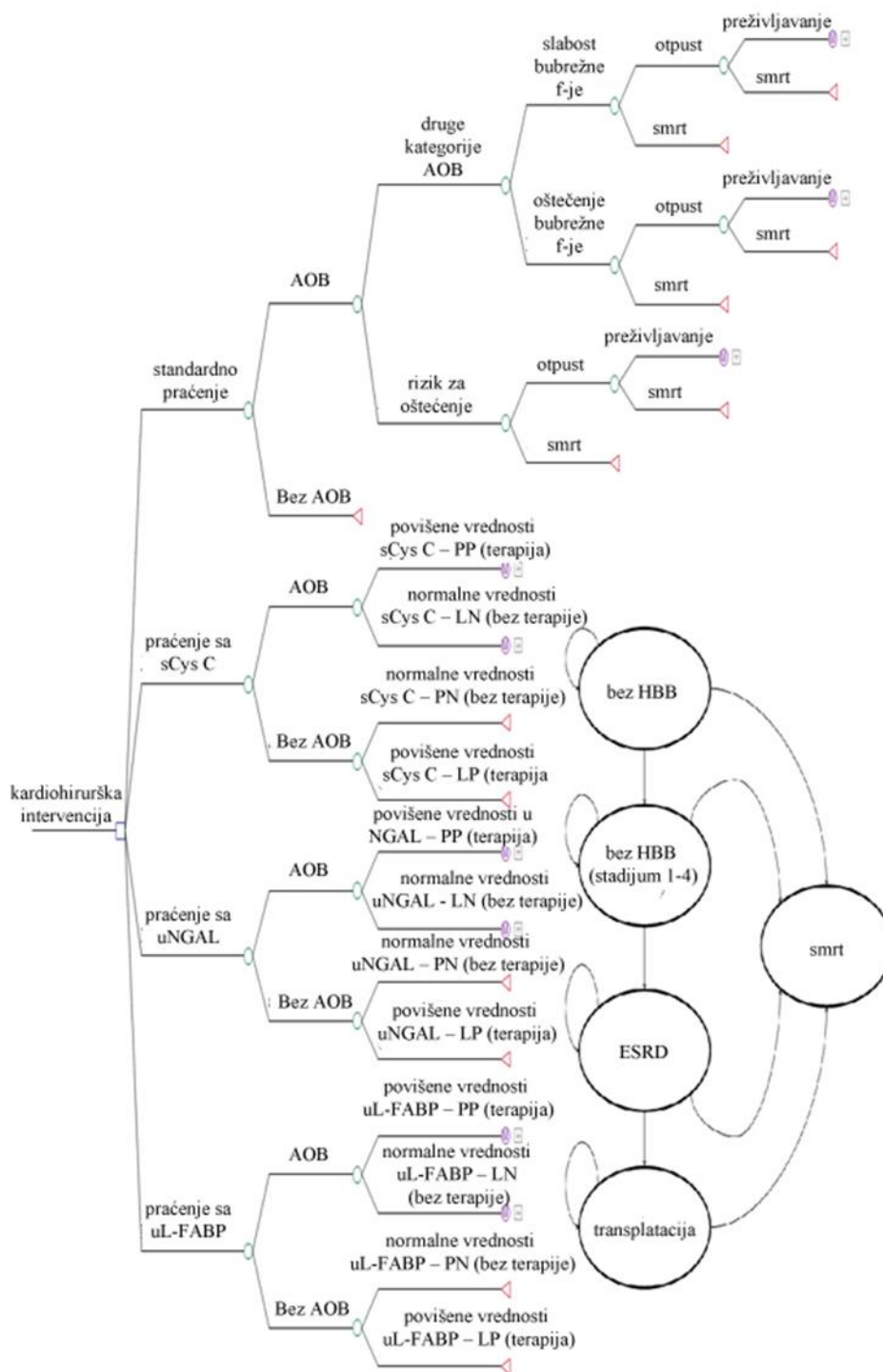
Parametar koji se često koristi kao pokazatelj efektivnosti jeste godine života prilagođene u odnosu na kvalitet [*Quality adjusted life-year (QALY)*], jer predstavlja zajednički imenitelj za različite zdravstvene intervencije. QALY uzima u razmatranje kvantitet kao i kvalitet života dobijen nakon određene zdravstvene intervencije, a predstavlja aritmetički proizvod očekivanog života i mere kvaliteta preostalih godina života (137). Upotrebom QALY vrednosti stavlja se akcenat na vreme provedeno u različitim zdravstvenim stanjima. Godina života u zdravom stanju vredi 1, a ista ta godina provedena

sa nekom bolešću ili tegobom ima vrednost od 0 do 1, dok se za smrt uzima vrednost 0. Ipak, pojedina stanja se smatraju gora i od smrti i mogu imati negativnu vrednost. Na ovaj način se određene metode mogu porediti i postaviti prioriteta prema intervencijama koje su relativno jeftine (mali trošak po QALY) i na one relativno skupe (visok trošak po QALY).

### **3.2.2. Model**

U ekonomskoj studiji razvijen je algoritam odlučivanja [*Decision-Analytic Model (DAM)*] za procenu QALY, dugoročnih troškova i inkrementalne isplativosti različitih dijagnostičkih strategija baziranih na primeni novih biomarkera AOB u kliničkoj praksi u odnosu na aktuelnu dijagnostičku strategiju (određivanje koncentracije kreatinina u serumu). Hipotetički DAM simulira ranu detekciju AOB nakon kardiohirurških intervencija, tretman pacijenata sa AOB, eventualnu progresiju AOB u HBB, i na kraju tretman HBB kod pacijenata mlađih od 18 godina, dok svaki član studijske populacije ne umre ili doživi 100 godina. Najpre su kroz “drvo odluke“ predstavljene različite metode za dijagnozu AOB kod pedijatrijskih pacijenata nakon primene CPB: standardno praćenje (određivanje koncentracije kreatinina u serumu) ili primena novih biomarkera AOB. Ukoliko je došlo do razvoja AOB pacijent ulazi u Markovljev model koga čine sledeća zdravstvena stanja: bez HBB, HBB (1-4 stadijum), završni stadijum bolesti bubrega [*end-stage renal disease (ESRD)*] i smrt. Dužina ciklusa koja određuje boravak studijske populacije u određenom stanju je definisana da traje godinu dana. Tokom ovog perioda pacijent može biti samo u jednom od navedenih zdravstvenih stanja. Kretanje pacijenata kroz model je predstavljeno tranzicionim verovatnoćama koje opisuju verovatnoću prelaska između zdravstvenih stanja tokom svakog ciklusa. Tranzicione verovatnoće u Markovljevom modelu utvrđene su sistematskim pregledom stručne literature za AOB kod dece posle kardiohirurških intervencija. *TreeAge Healthcare module version 1.5.2* (TreeAge Software, Inc, Williamstown, USA) je korišćen za kreiranje modela i sprovođenje analize osetljivosti. DAM je predstavljen na slici 9.





Slika 9: Algoritam odlučivanja (DAM)

Prva grana u DAM obuhvata strategiju u kojoj je postavljanje dijagnoze AOB nakon kardiohirurških intervencija zasnovano na praćenju koncentracije kreatinina u serumu. U ovom slučaju, pošto povećanje koncentracije kreatinina u serumu kasni u odnosu na već postojeće oštećenje bubrega, primenjena terapija može biti manje efikasna. Ostale tri grane u DAM opisuju strategije u kojima će tretman za AOB biti primenjen što je pre moguće kao rezultat ranije dijagnoze sa alternativnim dijagnostičkim strategijama, usled čega pacijenti mogu izbeći ozbiljne komplikacije tokom hospitalizacije, kao i one koje se mogu razviti nakon izlaska iz bolnice, uključujući razvoj HBB. U alternativnim dijagnostičkim strategijama, dijagnoza AOB je bazirana na primeni tri biomarkera: uNGAL, sCys C, i uL-FABP, koji su pokazali dobru tačnost za ranu dijagnozu AOB nakon kardiohirurških intervencija (138). Pretpostavljeno je da je blagovremena primena terapije kao rezultat ranije dijagnoze sa sCysC, uNGAL i uL-FABP povezana sa poboljšanim kliničkim ishodom. Pacijenti kod kojih je dijagnoza AOB postavljena alternativnim dijagnostičkim strategijama imaju verovatnoću razvoja HBB koja je za 25% manja u odnosu na pacijente kod kojih je dijagnoza AOB postavljena na osnovu koncentracije kreatinina (53, 139).

### ***3.2.2.1. Tranzicione verovatnoće za zdravstvena stanja***

Verovatnoće za razvoj AOB i mortalitet u bolnici izračunate su iz studije Peco i sar. (138). Ova studija je obuhvatila populaciju od 112 pedijatrijskih pacijenata kod kojih je primenjen CPB tokom kardiohirurške intervencije zbog kongenitalne srčane bolesti. Procena bubrežne funkcije izvršena je na osnovu izračunate vrednosti klirensa kreatinina primenom Schwartz-ove formule (14). Podela pacijenata u grupe prema razvoju AOB vršena je prema vrednostima klirensa kreatinina određenim 48h nakon operacije u odnosu na bazalne vrednosti (određene pre kardiohirurške intervencije). Ukoliko su vrednosti klirensa kreatinina nakon 48h bile niže za više od 25% u odnosu na bazalne vrednosti, pacijenti su svrstani u grupu sa AOB i obrnuto ukoliko je sniženje klirensa kreatinina bilo manje od 25% pacijenti su svrstani u grupu bez AOB. AOB je dijagnostikovano kod 18 pacijenata (16,1%). Sekundarni ishod je uključivao tri stepena jačine AOB definisanih na osnovu

pRIFLE sistema klasifikacije (13): “*Risk (R)*” kategorija je određena kao smanjenje GFR za više od 25% u odnosu na bazalne vrednosti, “*Injury (I)*” kao smanjenje vrednosti GFR za više od 50% i “*Failure (F)*” kao smanjenje vrednosti GFR za više od 75% ili potreba za dijalizom. "Težak oblik AOB" uključuje kategorije pRIFLE-I i -F. U ovom modelu primenjene tranzicione verovatnoće za razvoj AOB su računane u odnosu na definisane pRIFLE kategorije.

Osim toga, u ovaj model su uključene i verovatnoće za progresiju bubrežne bolesti i smrtnog ishoda nakon otpusta iz bolnice kod pacijenata koji su imali AOB. Korišćeni su podaci iz nekoliko studija praćenja progresije AOB do HBB koje su do sada sprovedene (19, 140). Pretpostavljeno je da stepen jačine AOB tokom hospitalizacije utiče samo na verovatnoću razvoja HBB, ali da nema uticaj kasnije na stadijum HBB.

### 3.2.2.2. Efektivnost biomarkera AOB

Na osnovu podataka iz studije Peco i sar. (138) za osetljivost i specifičnost izračunati su sledeći parametri: PP, LP, PN, LN rezultati za alternativne strategije sa sCysC, uNGAL i uL-FABP 2h posle operacije, a u poređenju sa vrednostima serumskog kreatinina u 48h koja je korišćena za postavljanje dijagnoze AOB, (tabela 6).

**Tabela 6.** Dijagnostičke karakteristike novih biomarkera

	Osetljivost	Specifičnost	PP	LN	PN	LP
<b>uL-FABP</b>	1	0,86	1	0	0,86	0,14
<b>sCys C</b>	0,54	0,82	0,56	0,44	0,82	0,18
<b>uNGAL</b>	0,63	0,60	0,61	0,39	0,61	0,39

pravi pozitivni (PP); lažno pozitivni (LP); pravi negativni (PN); lažno negativni (LN) rezultati

### **3.2.2.3. Merenje kvaliteta života**

Merenje kvaliteta života u ovoj ekonomskoj analizi bazirano je na primeni QALY, koji je jednostavno računat množenjem vremenskog perioda provedenog u određenom zdravstvenom stanju sa vrednošću za zdravstvenu korist koja odražava kvalitet života tokom tog istog zdravstvenog stanja. Podaci za zdravstvenu korist su uzeti iz *Cost-Effectiveness Analysis* (CEA) baze podataka (141).

### **3.2.3. Troškovi**

Primenjene dijagnostičke procedure uključuju merenje koncentracije kreatinina u serumu, sCysC, uNGAL i uL-FABP. Pošto je u studiji Peco i sar. (138), koncentracija kreatinina u serumu merena modifikovanom kinetičkom Jaffe-ovom reakcijom, korišćena je cena za kreatinin test iz cenovnika *St. John Hopkins* bolnice, jer se ova metoda najčešće koristi u laboratorijama. sCysC, uNGAL i uL-FABP su analizirani ELISA sendvič metodom (R & D Systems, Inc, Minneapolis, Minesota), u skladu sa preporukama proizvođača. Kako su primenjeni ELISA kitovi (kataloški brojevi: DSCTCO za sCysC, DLCN20 za uNGAL i Z-001 za uL-FABP) sadržali celokupan materijal potreban za rad, cene biomarker testova su računate samo na osnovu troškova za ELISA kitove. Cena testa je uključila potrošnju za kalibraciju (7 tačaka) i slepu probu reagensa, što je rađeno u duplikatu. Pored toga, obračunato je da je svaka analiza izvedena u triplikatu.

Retrospektivna analiza troškova hospitalizacije je izvedena korišćenjem američke baze podataka: *Healthcare Cost and Utilization Project* (HCUP) *Kids' Inpatient Database* (KID) iz 2009. godine za decu mlađu od 18 godina sa dijagnozom AOB i HBB u Sjedinjenim Američkim Državama. HCUP-KID je dizajniran da prati trendove bolničkog lečenja, kao i prateće troškove i postignute rezultate u Sjedinjenim Američkim Državama (142). Osim toga, podaci o troškovima za pregled lekara opšte prakse i specijaliste za postavljenje dijagnoze HBB su korišćeni iz studije Hoerger i sar. (143). Svi troškovi i ishodi su diskontovani za 3% (134). Diskontovanje je rađeno zbog razlike u vremenu kad su obračunavani troškovi i posledice za poredene strategije.

Prag isplativosti (*threshold*) je postavljen na 50000\$ po QALY, što je preporuka zdravstvenog sistema u Sjedinjenim Američkim Državama (144).

#### **3.2.4. Analiza osetljivosti**

Analiza osetljivosti je važan analitički instrument čiji je cilj da se proveri da li se zaključci iz datog istraživanja menjaju sa promenom pretpostavki (145). Ovoj analizi se pribegava uvek kada postoji nesigurnost u pogledu ključnih promenljivih, odnosno u slučaju nesigurnosti u istinske vrednosti nekih troškova ili rezultata istraživači biraju vrednost koja je najverovatnija. Posle menjaju ovu vrednost, a zatim ponavljaju izračunavanja da bi proverili da li se rezultati menjaju kod visokih i niskih pretpostavki. Ako se zaključci istraživanja ne promene sa promenom ovih vrednosti tada su rezultati analize neosetljivi prema varijacijama promenljive. Dakle, možemo prihvatiti zaključke tog istraživanja ako analiza osetljivosti obuhvata veliki broj mogućih vrednosti promenljive. Suprotno, ako se zaključci promene analizom osetljivosti tada nismo sasvim sigurni u njihovu korektnost.

U ekonomskoj studiji analiza osetljivosti je sprovedena za faktore koji bi mogli eventualno da ograniče rezultate studije. Nesigurnost modela je testirana primenom probabilističke analize osetljivosti upotrebom *Monte-Carlo* simulacije, pri čemu je izvršeno 10000 simulacija. U svakoj simulaciji, svi ulazni parametri (verovatnoće, troškovi i zdravstvena korist) su uzorkovani iz definisane distribucije za taj parametar (146). Diskontna stopa je varirana od 0% (nediskontovano) do 5% (134).

## **4. REZULTATI**

### **4.1. Biomarkeri AOB i parametri oksidativnog statusa kod dece sa IUT**

#### **4.1.1. Demografske i biohemijske karakteristike ispitivane populacije**

U istraživanje je bilo uključeno 50 dece starosti od 1 meseca do 12 godina sa prvom febrilnom IUT, od kojih su 28 bili muškog pola, a 22 su bila ženskog pola. 86% dece je bilo mlađe od 12 meseci, 8% su bili od 12 meseci do 36 meseci starosti, a 6% je bilo starije od 36 meseci. Kao što se moglo pretpostaviti, u većini slučajeva uzročnik IUT je bila *Escherichia coli* (88%, 44 slučaja). Prosečna dužina boravka u bolnici je bila 5,5 dana. Osnovne karakteristike ispitivane populacije prikazane su u tabeli 7.

Tabela 7. Demografske i biohemijske karakteristike u ispitivanoj populaciji

Demografski i biohemijski parametri	N=50
Starost (meseci)*	6,00 (4,00-7,00)
Pol, muški (%)	56
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	11,67±4,29
Temperatura (°C)	39,22±0,658
Trajanje povišene temperature (dani)	3,1±1,45
Boravak u bolnici (dani)*	5,46 (5,00-6,00)
GFR (mL/min/m <sup>2</sup> )	49,20±13,34
Kreatinin (µmol/L)	57,85±13,99
Ureja (mmol/L)*	2,87 (2,50-3,31)
Broj leukocita (x10e9/L)	17,55±5,92
Urinokultura (%)	
<i>Escherichia coli</i>	88
<i>Klebsiella</i>	4,8
<i>Proteus</i>	4,8
drugo	2,4
Terapija (%)	
Longacef (ceftriakson)	38,6
Amikacin	36,4
kombinacija	25,0

Podaci su prikazani kao aritmetička srednja vrednost ± SD, procenti, ili \* geometrijska sredina (95% interval pouzdanosti) za varijable koje nemaju normalnu raspodelu. Brzina glomerularne filtracije [*glomerular filtration rate* (GFR)]; indeks telesne mase (ITM).

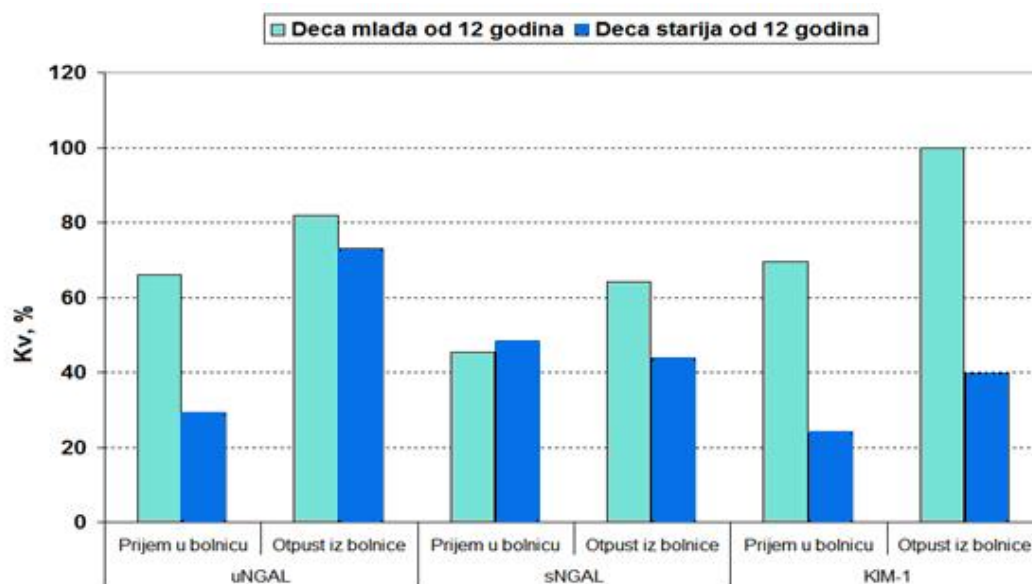
#### **4.1.2. Inter- i intra-individualna varijabilnost biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa**

Budući da se uzrast dece kretao u rasponu od 1 meseca do 12 godina, inter- i intra-individualna varijabilnost za svaki pojedinačan parametar izračunati su u vreme prijema u bolnicu i u vreme otpusta iz bolnice, posebno u grupama dece mlađe i starije od 12 meseci. Kv za uNGAL, sNGAL i KIM-1 kod mlađih i starijih pacijenata pri prijemu i otpustu iz bolnice prikazani su u tabeli 8. U grupi starije dece Kv za sve parametre su bili niži od Kv u grupi mlađe dece, osim sNGAL u vreme prijema u bolnicu, ali ta razlika nije bila značajna (45,3 kod mlađe dece i 48,4 kod starije dece). Isto tako, u svim grupama Kv su bili veći u vreme otpusta iz bolnice nego u vreme prijema u bolnicu, osim sNGAL u grupi starije dece (48,4 u vreme prijema i 43,9 u vreme otpusta iz bolnice). Interindividualna varijabilnost biomarkera AOB je predstavljena na slici 10.

**Tabela 8.** Koeficijenti varijacije za uNGAL, sNGAL i KIM-1 kod mlađih i starijih pacijenata pri prijemu i otpustu iz bolnice

	uNGAL		sNGAL		KIM-1	
Kv (%)	Prijem u bolnicu	Otpust iz bolnice	Prijem u bolnicu	Otpust iz bolnice	Prijem u bolnicu	Otpust iz bolnice
Deca mlađa od 12 godina	66,1	81,9	45,3	64,2	69,6	99,9
Deca starija od 12 godina	29,2	72,9	48,4	43,9	24,2	39,6



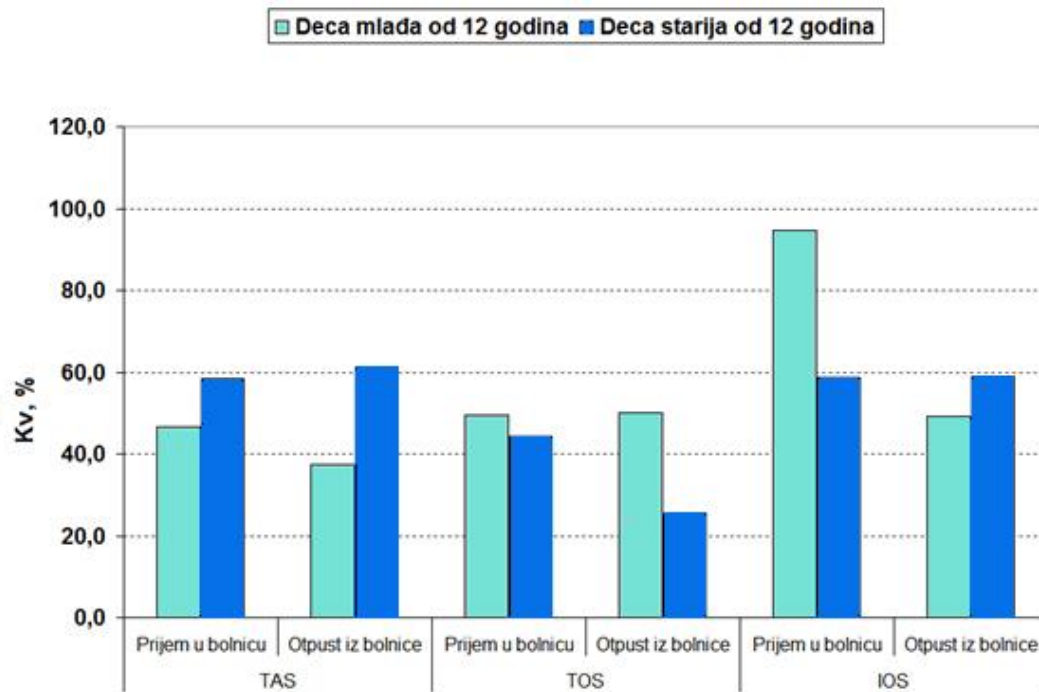


**Slika 10.** Interindividualna varijabilnost - poređenje koeficijenta varijacije za uNGAL, sNGAL i KIM-1 kod mlađih i starijih pacijenata pri prijemu i otpustu iz bolnice

Kv za TAS, TOS i OSI kod mlađih i starijih pacijenata pri prijemu i otpustu iz bolnice prikazani su u tabeli 9. Što se tiče parametara oksidativnog statusa, u grupi mlađe dece Kv za parametre TAS i OSI (pri otpustu iz bolnice) su bili niži od Kv u grupi starije dece. Suprotno tome, Kv za parametre TOS i OSI (pri prijemu u bolnicu) su bili viši u grupi mlađe dece u odnosu na grupu starije dece. Gledano u odnosu na dve tačke merenja, Kv za OSI je bio značajno veći u vreme prijema u bolnicu nego u vreme otpusta iz bolnice u grupi mlađe dece (94,7 pri prijemu i 49,1 pri otpustu), dok je Kv za TOS bio značajno veći u vreme prijema u bolnicu u odnosu na otpust iz bolnice, ali u grupi starije dece (44,2 pri prijemu i 25,6 pri otpustu). Interindividualna varijabilnost za parametre oksidativnog statusa je prikazana na slici 11.

**Tabela 9.** Koeficijenta varijacije za TAS, TOS i OSI kod mlađih i starijih pacijenata pri prijemu i otpustu iz bolnice

Kv (%)	TAS		TOS		OSI	
	Prijem u bolnicu	Otpust iz bolnice	Prijem u bolnicu	Otpust iz bolnice	Prijem u bolnicu	Otpust iz bolnice
Deca mlađa od 12 godina	46,6	37,3	49,6	50,2	94,7	49,1
Deca starija od 12 godina	58,4	61,2	44,2	25,6	58,8	59,1



**Slika 11.** Interindividualna varijabilnost – poređenje koeficijenta varijacije za TAS, TOS i OSI kod mlađih i starijih pacijenata pri prijemu i otpustu iz bolnice

Koeficijenti korelacije (intraindividualna varijabilnost) za biomarkere AOB u grupi mlađih i starijih ispitanika određeni tokom prijema u bolnicu i u vreme otpusta iz bolnice bili su značajni za uNGAL kod mlađih ispitanika ( $r=0,736$ ,  $P<0,001$ ) i za sNGAL kod starijih ispitanika ( $r=0,786$ ,  $P=0,036$ ). Slaganje između izmerenih vrednosti u trenutku prijema u bolnicu i u vreme otpusta iz bolnice za ostale parametre je bilo manje i bez statističke značajnosti. Takođe nije bilo razlike u ispitivanim parametrima između dece mlađe od 12 meseci, i dece starije od 12 meseci. Podaci koeficijenata korelacije za biomarkere AOB prikazani su u tabeli 10.

**Tabela 10.** Intraindividualna varijabilnost za uNGAL, sNGAL i KIM-1 kod mlađih i starijih pacijenata pri prijemu i otpustu iz bolnice

	<b>r</b>	<b>P</b>
<i>Mlađa deca</i>		
<b>sNGAL</b>	0,325	0,054
<b>uNGAL</b>	0,736	<0,001
<b>KIM-1</b>	0,127	0,446
<i>Starija deca</i>		
<b>sNGAL</b>	0,786	0,036
<b>uNGAL</b>	0,386	0,393
<b>KIM-1</b>	0,566	0,185

Koeficijenti korelacije za parametre oksidativnog statusa su prikazani u tabeli 11. U grupi mlađe dece za sve parametre oksidativnog statusa utvrđena je pozitivna korelacija između vrednosti izmerenih u vreme prijema u bolnicu i u vreme otpusta iz bolnice (TAS  $r=0,766$ ,  $P<0,001$ ; TOS  $r=0,694$ ,  $P<0,001$ ; OSI  $r=0,663$ ,  $P=0,001$ ). U grupi starije dece pozitivna korelacija je utvrđena samo za parametar TAS ( $r=0,884$ ,  $P=0,046$ ).

**Tabela 11.** Intraindividualna varijabilnost za TAS, TOS i OSI kod mlađih i starijih pacijenata pri prijemu i otpustu iz bolnice

	<b>r</b>	<b>P</b>
<i>Mlađa deca</i>		
<b>TOS</b>	0,694	<0,001
<b>TAS</b>	0,766	<0,001
<b>OSI</b>	0,663	0,001
<i>Starija deca</i>		
<b>TOS</b>	0,520	0,291
<b>TAS</b>	0,884	0,046
<b>OSI</b>	0,860	0,062

#### 4.1.3. Promene vrednosti biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa u vreme prijema i u vreme otpusta iz bolnice

Vrednosti biomarkera AOB i inflamacije u vreme prijema i u vreme otpusta iz bolnice su navedene u tabeli 12. Vrednosti svih biomarkera AOB bile su značajno više u vreme prijema u bolnicu od odgovarajućih vrednosti u vreme otpusta iz bolnice. Pored toga, koncentracije CRP su bile značajno niže tokom otpusta iz bolnice u odnosu na odgovarajuće vrednosti za vreme prijema u bolnicu ( $P < 0,001$ ).

**Tabela 12.** Biomarkeri bubrežne funkcije i inflamacije pri prijemu i otpustu iz bolnice

	<b>Prijem u bolnicu</b>	<b>Otpust iz bolnice</b>	<b>P</b>
<b>sNGAL, ng/mL</b>	153,9±75,0	91,3±56,6	<0,001
<b>uNGAL, ng/mL</b>	155,0±92,4	94,0±76,8	<0,001
<b>KIM-1, ng/mL</b>	0,38 (0,28-0,50)	0,24 (0,17-0,34)	0,037
<b>CRP, mg/L</b>	72,6 (54,4-97,0)	13,1 (9,7-17,7)	<0,001

Prikazane su aritmetičke srednje vrednosti  $\pm$  SD ili geometrijske sredine (95% interval pouzdanosti) za varijable koje nemaju normalnu raspodelu. Poređenje je izvršeno Student-t-testom za dve zavisne populacije.

Od parametara oksidativnog statusa samo su OSI vrednosti bile značajno niže tokom otpusta iz bolnice u odnosu na odgovarajuće vrednosti tokom prijema u bolnicu ( $P=0,026$ ). Vrednosti parametara oksidativnog statusa u vreme prijema i u vreme otpusta iz bolnice su navedene u tabeli 13.

**Tabela 13.** Parametri oksidativnog statusa pri prijemu i otpustu iz bolnice

	<b>Prijem u bolnicu</b>	<b>Otpust iz bolnice</b>	<b>P</b>
<b>TAS, mmol/L</b>	0,96±0,39	0,99±0,40	0,382 <sup>a</sup>
<b>TOS, μmol/L</b>	24,95 (18,13-35,58)	24,96 (18,61-34,92)	0,254 <sup>b</sup>
<b>OSI, AU</b>	0,035 (0,024-0,048)	0,029 (0,016-0,039)	0,026 <sup>b</sup>

Prikazane su aritmetičke srednje vrednosti  $\pm$  SD za normalno distribuirane varijable ili medijane (inter-kvartilni opseg) za varijable koje nemaju normalnu raspodelu. a Prema Student-t-testu za dve zavisne populacije; b Prema Wilcoxon signed-rank testu.

#### **4.1.4. Promene vrednosti biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa u odnosu na trajanje inflamacije**

Efekat trajanja inflamacije (izražen u odnosu na koncentraciju CRP) na nivo parametara AOB je prikazan u tabeli 14. Primenom ANCOVA, korekcijom za bazalne vrednosti (vrednosti u trenutku prijema u bolnicu), utvrđeno je da su koncentracije uNGAL kod ispitanika sa dužim trajanjem inflamacije bile više (115,37 ng/mL) u odnosu na uNGAL koncentracije ispitanika sa kraćim trajanjem inflamacije u isto vreme (67,87 ng/mL,  $P=0,022$ ).

**Tabela 14.** Efekti inflamacije na nivo parametara bubrežne funkcije pri otpustu iz bolnice kada su vrednosti pri prijemu u bolnicu korišćene kao kovarijabla

	<b>Kraće trajanje inflamacije</b>	<b>Duže trajanje inflamacije</b>	<b>P</b>
<b>sNGAL, ng/mL</b>	78,80±14,68	104,82±10,17	0,155
<b>uNGAL, ng/mL</b>	67,87±16,04	115,37±11,72	0,022
<b>KIM-1, ng/mL</b>	0,169 (0,08-0,34)	0,295 (0,182-0,479)	0,198

Prikazane su korigovane aritmetičke srednje vrednosti  $\pm$  SD ili geometrijske sredine (95% interval pouzdanosti) za varijable koje nemaju normalnu raspodelu. Poređenje je izvršeno ANCOVA analizom uz korekciju za bazalne vrednosti.

Nakon uključivanja uzrasta pacijenata kao dodatne kovarijabla, razlike u vrednostima uNGAL između navedenih grupa ostale su značajne,  $P=0,031$ . sNGAL ( $P=0,155$ ) i KIM-1 ( $P=0,198$ ) nivoi nisu pokazali značajno povećanje u grupi ispitanika sa dužim trajanjem inflamacije u odnosu na grupu sa kraćim trajanjem inflamacije.

Od parametara oksidativnog statusa u zavisnosti od dužine trajanja inflamacije značajnu promenu su pokazali TAS i OSI. TAS vrednosti su bile značajno više kod pacijenata sa dužim trajanjem inflamacije ( $0,99 \text{ mmol/L} \pm 0,40 \text{ mmol/L}$ ) u odnosu na one kod kojih je inflamacija kraće trajala ( $0,57 \text{ mmol/L} \pm 0,37 \text{ mmol/L}$ ),  $P=0,017$ . Shodno tome, OSI vrednosti su bile značajno niže u grupi sa dužim trajanja inflamacije [ $0,032 \text{ AU}$  ( $0,018-0,042$ )] nego u grupi sa kraćim trajanjem inflamacije [ $0,041 \text{ AU}$  ( $0,029-0,053$ )],  $P=0,037$ . Efekat trajanja inflamacije (izražen u odnosu na koncentraciju CRP) na nivo parametara oksidativnog statusa je prikazan u tabeli 15.

**Tabela 15.** Efekti inflamacije na nivo parametara oksidativnog statusa pri otpustu iz bolnice

	Kraće trajanje inflamacije	Duže trajanje inflamacije	<i>P</i>
TAS, mmol/L	0,57±0,37	0,99±0,40	0,017 <sup>a</sup>
TOS, μmol/L	20,86 (17,43–49,45)	27,71 (16,94–35,75)	0,978 <sup>b</sup>
OSI, AU	0,041 (0,029–0,053)	0,032 (0,018–0,042)	0,037 <sup>b</sup>

Prikazane su aritmetičke srednje vrednosti ± SD ili medijane (inter-kvartilni opseg) za varijable koje nemaju normalnu raspodelu. a Prema Student-t-testu za dve nezavisne populacije; b Prema Mann-Whitney testu.

#### 4.1.5. Dijagnostička tačnost biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa za detekciju dužeg trajanja inflamacije

##### 4.1.5.1. Dijagnostička tačnost biomarkera AOB za detekciju dužeg trajanja inflamacije

Sposobnost biomarkera AOB za detekciju dužeg trajanja inflamacije ispitivana je analizom ROC krive. Analizirane su vrednosti biomarkera AOB na prijemu u bolnicu. Dobijene AUC vrednosti predstavljene su u tabeli 16. Vrednosti parametara pri prijemu u bolnicu za KIM-1 (AUC=0,519, P=0,847), uNGAL (AUC=0,549, P=0,638), sNGAL (AUC=0,516, P=0,855), kreatinin (AUC=0,538, P=0,695) i ureju (AUC=0,560, P=0,538) nisu imale sposobnost da detektuju duže trajanje inflamacije. Dodatno je ispitana dijagnostička tačnost broja leukocita, koji se koriste kao pokazatelji inflamacije i očekivano broj leukocita na prijemu u bolnicu je ispoljio značajnu sposobnost za detekciju dužeg trajanja inflamacije (AUC=0,688, P=0,047).

**Tabela 16.** Dijagnostička tačnost parametara AOB za detekciju dužeg trajanja inflamacije

	<b>AUC (95% interval pouzdanosti) vrednosti pri prijemu u bolnicu</b>	<b>P</b>
<b>Broj leukocita</b>	0,688 (0,513-0,864)	0,047
<b>Ureja</b>	0,560 (0,249-0,630)	0,538
<b>Kreatinin</b>	0,538 (0,313-0,698)	0,695
<b>sNGAL</b>	0,516 (0,346-0,686)	0,855
<b>uNGAL</b>	0,549 (0,352-0,745)	0,638
<b>KIM-1</b>	0,519 (0,329-0,709)	0,847

**4.1.5.2. Dijagnostička tačnost parametara oksidativnog statusa za detekciju dužeg trajanja inflamacije**

Analizom ROC krive ispitana je i sposobnost parametara oksidativnog statusa na prijemu u bolnicu za detekciju dužeg trajanja inflamacije, a dobijene AUC vrednosti predstavljene su u tabeli 17. Vrednosti parametara TAS (AUC=0,785, P=0,023) i OSI (AUC=0,765, P=0,036) pri prijemu u bolnicu su imale sposobnost da detektuju duže trajanje inflamacije. U poređenju sa brojem leukocita, parametrom koji se uobičajeno koristi kao pokazatelj inflamacije, dijagnostička tačnost parametara oksidativnog statusa TAS i OSI za detekciju dužeg trajanja inflamacije je čak bila bolja.

**Tabela 17.** Dijagnostička tačnost parametara oksidativnog statusa za detekciju dužeg trajanja inflamacije

	<b>AUC (95% interval pouzdanosti) vrednosti pri prijemu u bolnicu</b>	<b>P</b>
<b>Broj leukocita</b>	0,688 (0,513-0,864)	0,047
<b>TAS</b>	0,785 (0,601-0,969)	0,023
<b>TOS</b>	0,503 (0,250-0,757)	0,978
<b>OSI</b>	0,765 (0,566-0,963)	0,036



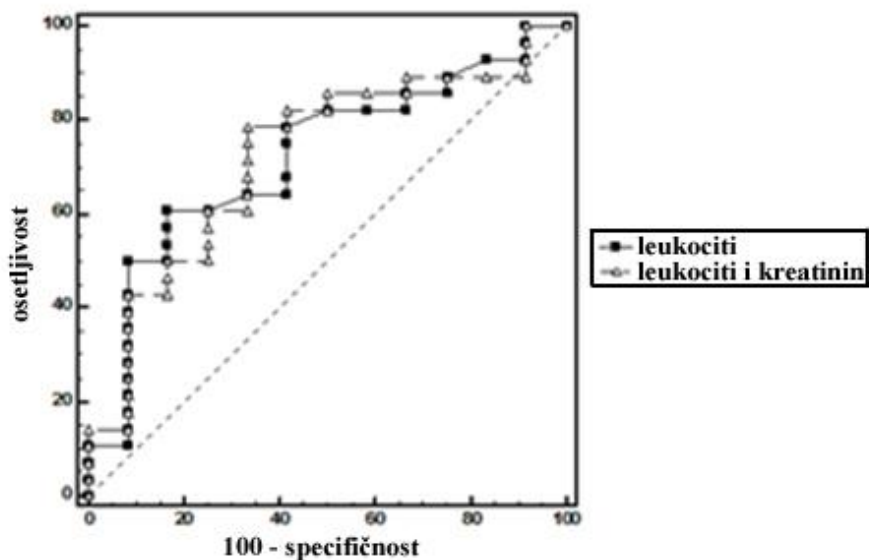
#### 4.1.6 Ispitivanje dijagnostičke tačnosti biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa za detekciju dužeg trajanja inflamacije u kombinaciji sa brojem leukocita

##### 4.1.6.1. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti biomarkera AOB za detekciju dužeg trajanja inflamacije u kombinaciji sa brojem leukocita

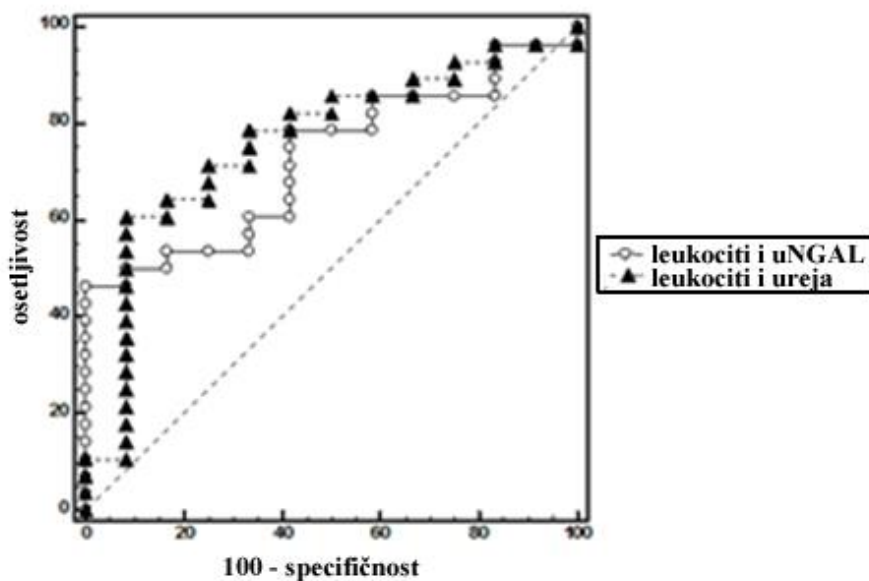
Ispitana je takođe i potencijalna korist od dodavanja biomarkera AOB broju leukocita u cilju bolje detekcije pacijenata sa dužim trajanjem inflamacije u odnosu na one kod kojih je inflamacija trajala kraće. Dobijene AUC vrednosti kombinacije parametara AOB i broja leukocita predstavljene su u tabeli 18. Dodatak kreatinina, AUC=0,723, P=0,027 (slika 12, panel A) i ureje, AUC=0,762, P=0,009 (slika 12, panel B) je povećao AUC za broj leukocita, dok je dodatak uNGAL (AUC=0,695, P=0,041), (slika 12, panel B) imao marginalni efekat. sNGAL i KIM-1 ne povećavaju značajno dijagnostičku tačnost broja leukocita u detekciji dužeg trajanja inflamacije.

**Tabela 18.** Dijagnostička tačnost kombinacije biomarkera AOBi broja leukocita za detekciju dužeg trajanja inflamacije

	<b>AUC (95% interval pouzdanosti) vrednosti pri prijemu u bolnicu</b>	<b>P</b>
<b>Broj leukocita i ureja</b>	0,762 (0,598-0,926)	0,009
<b>Broj leukocita i kreatinin</b>	0,723 (0,551-0,896)	0,027
<b>Broj leukocita i uNGAL</b>	0,695 (0,529-0,860)	0,041
<b>Broj leukocita i sNGAL</b>	0,667 (0,519-0,875)	0,058
<b>Broj leukocita i KIM-1</b>	0,661 (0,482-0,839)	0,093



Panel A



Panel B

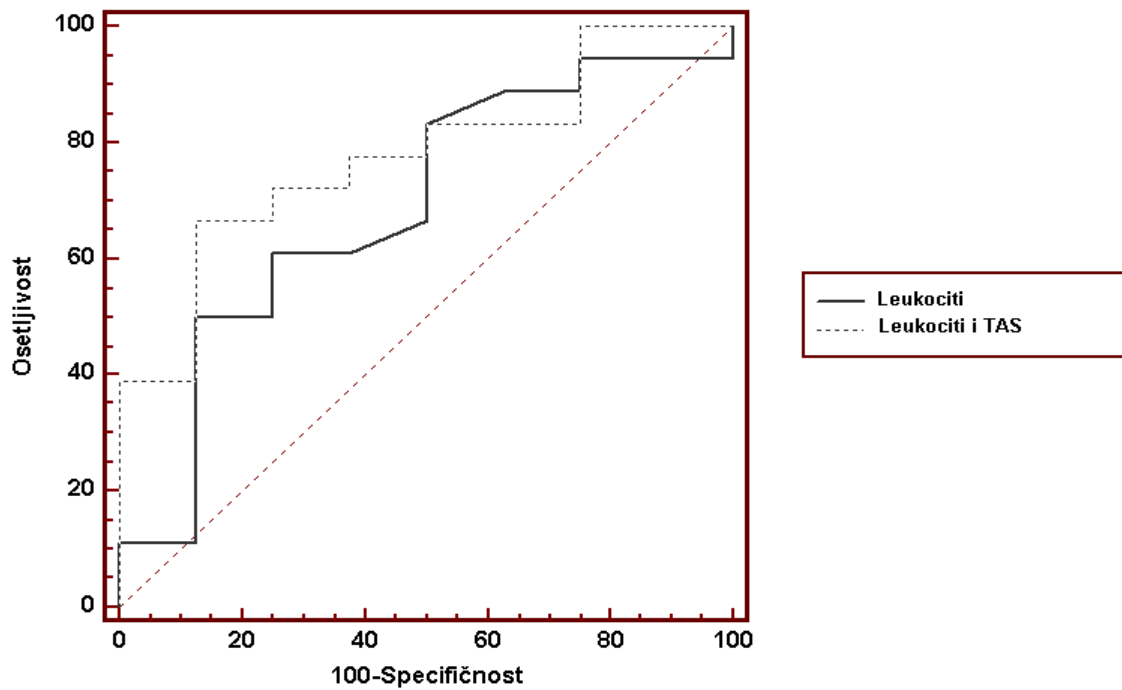
**Slika 12.** ROC krive za parametre sa značajnom dijagnostičkom sposobnošću za detekciju trajanja inflamacije. Panel A: ROC krive za broj leukocita i za kombinaciju broja leukocita sa kreatininom za detekciju dužeg trajanja inflamacije; panel B: ROC krive za kombinaciju broja leukocita sa urejom i sa uNGAL za detekciju dužeg trajanja inflamacije

#### **4.1.6.2. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti parametara oksidativnog statusa za detekciju dužeg trajanja inflamacije u kombinaciji sa brojem leukocita**

Pored biomarkera AOB, ispitana je i potencijalna korist od dodavanja parametara oksidativnog statusa broju leukocita u cilju bolje detekcije dužeg trajanja inflamacije, a dobijene AUC vrednosti kombinacije parametara oksidativnog statusa i broja leukocita predstavljene su u tabeli 19. Nijedan od ispitivanih modela nije pokazao bolju dijagnostičku tačnost od pojedinačnih parametara. Iako su AUC vrednosti bile od 0,7 i veće, samo je u slučaju kombinacije broja leukocita i parametra TAS dobijena statistička značajnost (AUC=0,778, P=0,026). Dodatak TAS povećao je AUC za broj leukocita, a ROC kriva kombinacije broja leukocita i TAS predstavljena je na slici 13.

**Tabela 19.** Dijagnostička tačnost kombinacije parametara oksidativnog statusa i broja leukocita za detekciju dužeg trajanja inflamacije

	<b>AUC (95% interval pouzdanosti) vrednosti pri prijemu u bolnicu</b>	<b>P</b>
<b>Broj leukocita i TAS</b>	0,778 (0,594-0,962)	0,026
<b>Broj leukocita i TOS</b>	0,694 (0,460-0,928)	0,120
<b>Broj leukocita i OSI</b>	0,735 (0,519-0,952)	0,062



Slika 13. ROC krive za broj leukocita i za kombinaciju broja leukocita sa TAS za detekciju dužeg trajanja inflamacije

#### 4.1.7. Promene vrednosti biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa u odnosu na razvoj AOB

Najpre su primenom Student t-testa za dva nezavisna uzorka analizirane promene svih demografskih karakteristika i biohemijskih parametara ispitivane populacije u odnosu na razvoj AOB. Razlike između pacijenata bez AOB i pacijenata sa AOB prikazane su u tabeli 20. Statistički značajna razlika je utvrđena kod demografskih karakteristika starosti i trajanja povišene temperature i parametra ureje. Očekivano, za ureju dobijene vrednosti su bile značajno više u grupi pacijenata sa AOB u odnosu na grupu pacijenata bez AOB.

**Tabela 20.** Razlike između pacijenata bez AOB i pacijenata sa AOB

	<b>Pacijenti bez AOB (n=28)</b>	<b>Pacijenti sa AOB (n=22)</b>	<b>P</b>
<b>Starost (meseci)*</b>	3,3 (2,37-4,40)	11,7 (7,07-18,12)	0,037
<b>Pol, muški (%)</b>	61,5	38,5	0,102
<b>ITM (kg/m<sup>2</sup>)</b>	10,36±2,02	12,88±5,69 <sup>a</sup>	0,905
<b>Temperatura (°C)</b>	39,17±0,58	39,22±0,77	0,807
<b>Trajanje povišene temperature (dani)</b>	2,74±1,29	3,75±1,52 <sup>a</sup>	0,023
<b>Boravak u bolnici (dani)*</b>	5,41 (4,24-6,90)	5,89 (5,21-7,61)	0,567
<b>Ureja (mmol/L)*</b>	2,47 (2,06-2,98)	3,40 (2,61-4,42) <sup>a</sup>	0,045
<b>Broj leukocita (x10e9/L)</b>	16,38±5,16	19,12±6,5 <sup>a</sup>	0,131
<b>Urinokultura (%)</b>			
<i>Escherichia coli</i>	90,9	85,0	0,499
<i>Klebsiella</i>	4,5	5	
<i>Proteus</i>	0	10	
<b>drugo</b>	4,5	0	
<b>Terapija (%)</b>			
<b>Longacef (ceftriakson)</b>	39,1	38,1	0,595
<b>Amikacin</b>	30,4	42,9	
<b>kombinacija</b>	30,5	19,0	

Podaci su srednja vrednost ± SD, procenti, ili \* geometrijska sredina (95% interval pouzdanosti) za varijable koje nemaju normalnu raspodelu. <sup>a</sup> značajno različito od grupe bez AOB rađeno Student t-testom. Indeks telesne mase (ITM).

Analizirane su razlike u bazalnim vrednostima biomarkera sNGAL, uNGAL i KIM-1 u odnosu na razvoj AOB, a dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 21. Značajna razlika u bazalnim vrednostima između grupa sa AOB (0,519 ng/mL) i bez AOB (0,287 ng/mL) utvrđena je jedino za KIM-1,  $P=0,038$ .

**Tabela 21.** Bazalne vrednosti biomarkera AOB kod dece podeljene u dve grupe u zavisnosti od razvoja AOB

	Pacijenti bez AOB n=27	Pacijenti sa AOB n=23	<i>P</i>
sNGAL, ng/mL	154,97 ± 73,67	151,13 ± 75,98	0,864
uNGAL, ng/mL	164,79 ± 99,99	134,11 ± 83,53	0,271
KIM-1, ng/mL	0,287 (0,167-0,495)	0,519 (0,387-0,692)	0,038

Prikazane su aritmetičke srednje vrednosti ± SD ili geometrijske sredine (95% interval pouzdanosti) za varijable koje nemaju normalnu raspodelu. Prema Student-t-testu za dve nezavisne populacije.

Osim toga, analizirane su i razlike u bazalnim vrednostima parametara oksidativnog statusa TAS, TOS i OSI u odnosu na razvoj AOB. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 22. Nisu pronađene značajne razlike u bazalnim vrednostima parametara oksidativnog statusa između grupa sa i bez AOB.

**Tabela 22.** Bazalne vrednosti parametara oksidativnog statusa kod dece podeljene u dve grupe u zavisnosti od razvoja AOB

	Pacijenti bez AOB n=27	Pacijenti sa AOB n=23	<i>P</i>
TAS, mmol/L	0,84±0,46	0,97±0,44	0,459 <sup>a</sup>
TOS, μmol/L	25,59 (18,89–36,83)	23,57 (17,34-34,90)	0,804 <sup>b</sup>
OSI, AU	0,034 (0,025-0,051)	0,035 (0,016-0,044)	0,488 <sup>b</sup>

Prikazane su aritmetičke srednje vrednosti ± SD ili medijane (inter-kvartilni opseg) za varijable koje nemaju normalnu raspodelu. a Prema Student-t-testu za dve nezavisne populacije; b Prema Mann-Whitney testu.

#### **4.1.8. Dijagnostička tačnost biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa za detekciju AOB**

##### **4.1.8.1. Dijagnostička tačnost biomarkera AOB za detekciju AOB**

Sposobnost biomarkera za detekciju AOB ispitana je analizom ROC krive. Dobijene AUC vrednosti predstavljene su u tabeli 23. Iako su utvrđene značajno različite vrednosti za KIM-1 između grupa sa i bez AOB, tokom prijema pacijenata u bolnicu KIM-1 nije pokazao sposobnost razdvajanja pacijenata sa AOB i bez AOB (AUC=0,620, P=0,175). Očekivano, sposobnost razdvajanja nisu pokazali ni parametri sNGAL (AUC=0,538, P=0,666) i uNGAL (AUC=0,585, P=0,329). S druge strane, AUC vrednost za ureju je bila viša (AUC=0,681, P=0,040). Dijagnostička tačnost kreatinina nije analizirana, jer je na osnovu izračunavanja klirensa kreatinina primenom Schwartz-ove formule postavljena dijagnoza AOB.

**Tabela 23.** Dijagnostička tačnost biomarkera bubrežne funkcije za detekciju AOB

	<b>AUC (95% interval pouzdanosti) vrednosti pri prijemu u bolnicu</b>	<b>P</b>
<b>Ureja</b>	0,681 (0,517-0,845)	0,040
<b>sNGAL</b>	0,538 (0,365-0,710)	0,666
<b>uNGAL</b>	0,585 (0,417-0,753)	0,329
<b>KIM-1</b>	0,620 (0,449-0,792)	0,175

##### **4.1.8.2. Dijagnostička tačnost parametara oksidativnog statusa za detekciju AOB**

Analizom ROC krive ispitana je i sposobnost parametara oksidativnog statusa na prijemu u bolnicu za detekciju AOB, a dobijene AUC vrednosti predstavljene su u tabeli 24. Budući da nisu pronađene značajne razlike u bazalnim vrednostima parametara oksidativnog statusa između grupa sa i bez AOB, tokom prijema pacijenata u bolnicu

parametri TAS, TOS i OSI nisu pokazali sposobnost razdvajanja pacijenata sa AOB i bez AOB.

**Tabela 24.** Dijagnostička tačnost parametara oksidativnog statusa za detekciju AOB

	<b>AUC (95% interval pouzdanosti) vrednosti pri prijemu u bolnicu</b>	<b>P</b>
<b>TAS</b>	0,595 (0,380-0,809)	0,394
<b>TOS</b>	0,531 (0,312-0,749)	0,783
<b>OSI</b>	0,582 (0,361-0,803)	0,467

#### **4.1.9. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa za detekciju AOB u kombinaciji sa urejom**

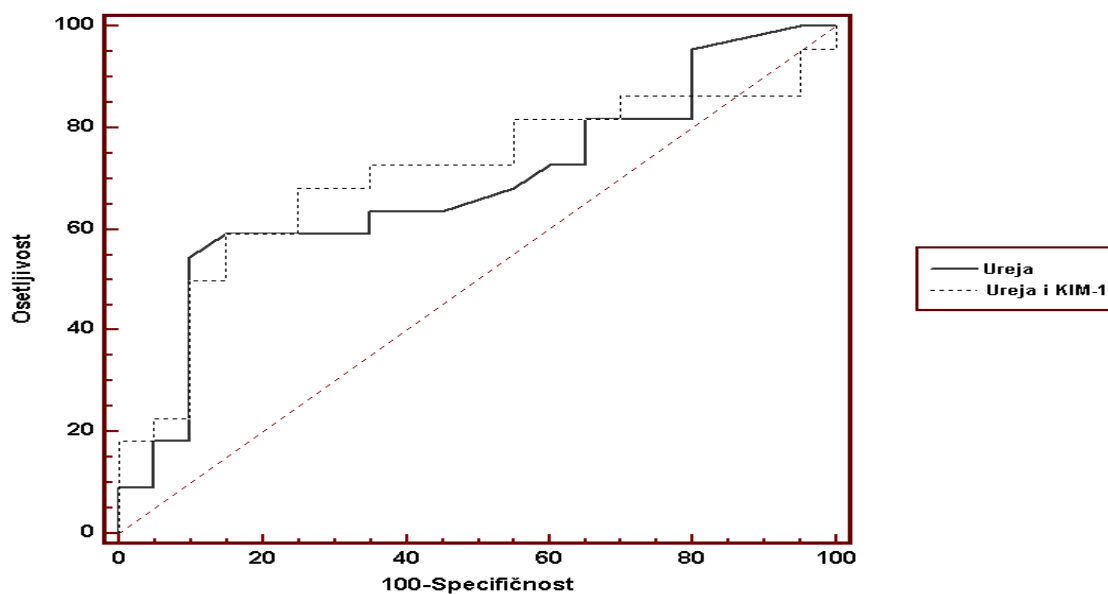
##### **4.1.9.1. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti biomarkera AOB za detekciju AOB u kombinaciji sa urejom**

Pošto je samo ureja imala statistički značajnu dijagnostičku tačnost za detekciju AOB, vrednosti ureje su kombinovane sa vrednostima biomarkera AOB na prijemu u bolnicu u cilju bolje detekcije pacijenata sa AOB u odnosu na one kod kojih nije došlo do razvoja AOB. Dobijene AUC vrednosti kombinacije biomarkera AOB i ureje predstavljene su u tabeli 25. Kombinacija KIM-1 sa urejom povećala je sposobnost ureje da detektuje pacijente sa većim rizikom za razvoj AOB (AUC=0,705, P=0,023), (slika 14). Dodatak sNGAL (AUC=0,680, P=0,041) nije povećao dijagnostičku tačnost ureje u detekciji AOB, dok je dodatak uNGAL (AUC=0,715, P=0,015) u najvećoj meri povećao dijagnostičku tačnost ureje, (slika 15).

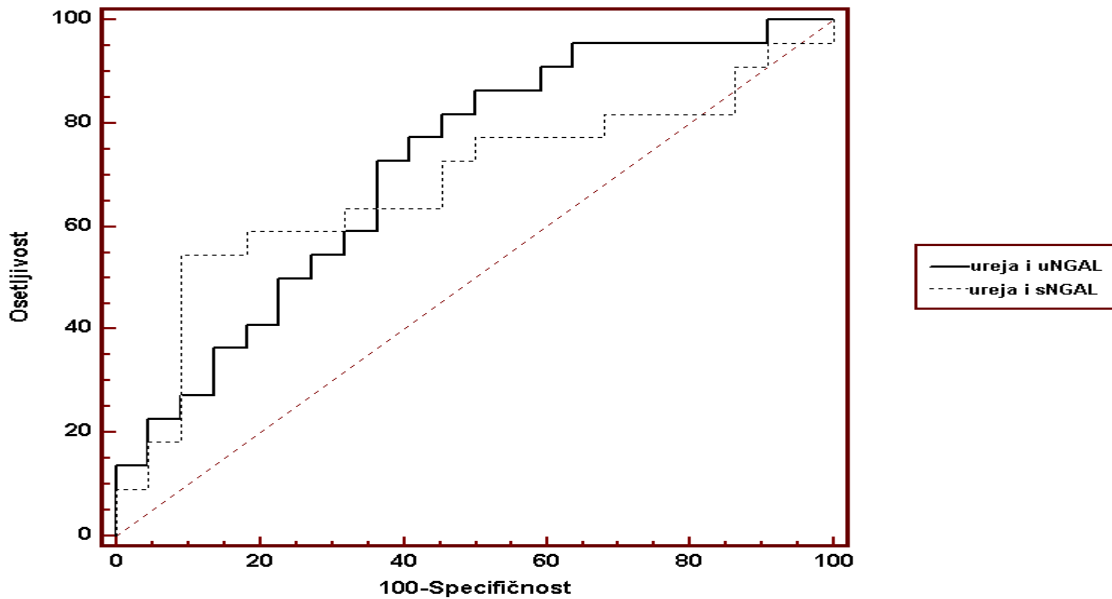


**Tabela 25.** Dijagnostička tačnost kombinacije biomarkera AOB i ureje za detekciju AOB

	<b>AUC (95% interval pouzdanosti) vrednosti pri prijemu u bolnicu</b>	<b>P</b>
<b>Ureja i sNGAL</b>	0,680 (0,515-0,845)	0,041
<b>Ureja i uNGAL</b>	0,715 (0,562-0,867)	0,015
<b>Ureja i KIM-1</b>	0,705 (0,541-0,868)	0,023



**Slika 14.** ROC krive za ureju i za kombinaciju ureje sa KIM-1 za detekciju AOB



Slika 15. ROC krive za kombinaciju ureje sa uNGAL i kombinaciju ureje sa sNGAL za detekciju AOB

#### 4.1.9.2. Ispitivanje dijagnostičke tačnosti parametara oksidativnog statusa za detekciju AOB u kombinaciji sa urejom

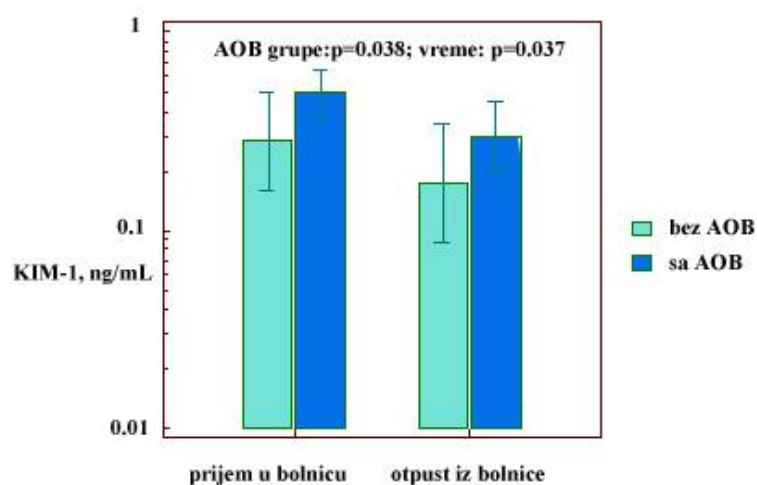
Pored biomarkera AOB, ispitana je i potencijalna korist od dodavanja parametara oksidativnog statusa ureji u cilju bolje detekcije AOB, a dobijene AUC vrednosti kombinacije parametara oksidativnog statusa i ureje predstavljene su u tabeli 26. Nijedan od ispitivanih modela nije pokazao bolju dijagnostičku tačnost od pojedinačnih parametara.

**Tabela 26.** Dijagnostička tačnost kombinacije parametara oksidativnog statusa i ureje za detekciju AOB

	AUC (95% interval pouzdanosti) vrednosti pri prijemu u bolnicu	P
Ureja i TAS	0,637 (0,422-0,853)	0,225
Ureja i TOS	0,709 (0,499-0,918)	0,065
Ureja i OSI	0,680 (0,451-0,910)	0,118

#### 4.1.10. Promena biomarkera AOB u zavisnosti od prisustva AOB i vremena provedenog u bolnici

KIM-1 je jedini biomarker čije su se koncentracije značajno razlikovale između dve tačke merenja (u vreme prijema u bolnicu i u vreme otpusta iz bolnice, i slično značajna razlika je uočena u izlučivanju KIM-1 među grupama sa AOB i bez AOB (AOB grupe:  $P=0,038$ ; vreme:  $P=0,037$ ; AOB grupa  $\times$  vreme:  $P=0,971$ ; ANOVA sa ponavljanjem, slika 16).



**Slika 16.** KIM-1 koncentracije u vreme prijema pacijenata u bolnicu i u vreme otpusta iz bolnice između pacijenata sa i bez AOB. Na slici su prikazane srednje vrednosti i standardne greške

## 4.2. Ekonomska analiza primene biomarkera AOB kod dece u kardiohirurgiji

### 4.2.1. Varijable korišćene u osnovnom modelu

Sve tranzicione verovatnoće prelaska između zdravstvenih stanja, koje su korišćene u osnovnom modelu i njihovi izvori, navedeni su u tabeli 27.

**Tabela 27.** Tranzicione verovatnoće za odgovarajuća zdravstvena stanja

Zdravstvena stanja	Verovatnoća	Izvor
Razvoj AOB kod pedijatrijskih pacijenata tokom kardiohirurških intervencija	0,16	(138)
Pacijenti klasifikovani kao "pRIFLE-R"	0,56	(138)
Pacijenti klasifikovani kao "pRIFLE-I" i "pRIFLE-F"	0,22	(138)
Smrtnost tokom boravka u bolnici za "pRIFLE-R" pacijente	0,10	(138)
Smrtnost tokom boravka u bolnici za "pRIFLE-I" i "pRIFLE-F" pacijente	0,25	(138)
Stopa preživljavanja pacijenata sa AOB (3-5 godina)*	0,80	(19)
Razvoj HBB kod AOB pacijenata	0,10	(140)
Razvoj HBB kod AOB pacijenata nakon rane primene terapije	0,075	(53, 139)
Progresija do ESRD kod dece sa HBB stadijumom 2-4 (3 godine)*	0,39	(147)
Transplantacija nakon razvoja ESRD (3 godine)*	0,75	(148)
Smrtnost kod transplantiranih i dijaliznih pedijatrijskih pacijenata (5 godina)*	0,08	(149)
Godišnja smrtnost	Varira u odnosu na starost	(150)

\* - sve tranzicione verovatnoće su računane kao verovatnoće za godinu dana pretpostavljajući konstantnu stopu

Merenje kvaliteta života je bazirano na izračunavanju QALY, a QALY vrednost je računata množenjem vremenskog perioda provedenog u određenom zdravstvenom stanju sa vrednošću procenjene zdravstvene koristi. Podaci za zdravstvenu korist su prikazani u tabeli 28.

**Tabela 28.** Zdravstvena korist u različitim zdravstvenim stanjima u osnovnoj analizi

<b>Zdravstvena stanja</b>	<b>Zdravstvena korist na godišnjem nivou</b>	<b>Izvor</b>
Bez HBB (populacija dece)	0,93	(141)
HBB	0,85	(141)
ESRD	0,61	(141)
Transplantacija	0,74	(141)
Smrt	0	

#### **4.2.2. Troškovi**

Analiza TE je izvedena iz perspektive institucija koje finansiraju zdravstvo. U obzir su uzeti samo direktni medicinski troškovi. Troškovi dijagnostičkog ispitivanja, hospitalizacije, pregleda nefrologa i RRT su izraženi u dolarima (\$) i predstavljeni u tabeli 29.

**Tabela 29.** Direktni medicinski troškovi korišćeni u osnovnom modelu

	<b>Trošak(\$)</b>	<b>Izvor</b>
Kreatinin	14	(151)
Cys C ELISA test	18,94	(152)
NGAL ELISA test	17,81	(152)
L-FABP ELISA test	24,38	(152)
AOB (nakon kardiohirurških intervencija)	18323	(142)
HBB - prvo skrining ispitivanje	80,32	(143)
HBB - skrining ako je prvi bio pozitivan	62,64	(143)
HBB diagnoza (GFR<60)	214,75	(143)
Godišnje praćenje specijaliste (GFR<60)	77,28	(143)
Godišnje praćenje lekara opšte prakse (3 po godini)	120,48	(143)
HBB kod dece	38893	(142)
ESRD prva godina	72348	(153)
ESRD sledeće godine	59963	(153)
Transplantacija bubrega kod dece	70193	(142)
Praćenje pacijenata nakon transplantacije	13749	(154)

#### 4.2.3. Analiza odnosa troškova i efektivnosti

Rezultati ekonomske analize su prikazani kao inkrementalni odnos TE [*incremental cost-effectiveness ratio* (ICER)]. ICER vrednost predstavlja dodatne troškove po dodatnoj efikasnosti svake alternativne dijagnostičke strategije u odnosu na dijagnostičku strategiju koja se trenutno primenjuje, a to je određivanje koncentracije kreatinina u serumu. Ako je dobijena ICER vrednost niža u odnosu na postavljen prag isplativosti, smatra se da je analizirana strategija isplativa.

Rezultati osnovnog modela poredе troškove i QALY sadašnje dijagnostičke strategije (praćenje koncentracije kreatinina u serumu) sa troškovima i QALY dijagnostičkih strategija zasnovanih na primeni novih biomarkera (tabela 30). Procena je izvršena za životni vek ispitivanih pacijenata do maksimalnih 100 godina. Odnosi TE za sve strategije su bili između 1483\$/QALY za kreatinin i 3578\$/QALY za uNGAL. ICER vrednosti za sve nove biomarkere su bile značajno niže u odnosu na postavljeni prag isplativosti od 50000\$/QALY, tako da su analizirane dijagnostičke strategije primene biomarkera za AOB bile isplative u odnosu na aktuelnu dijagnostičku metodu. Međutim, strategije bazirane na primeni uNGAL i sCysC su imale veće troškove i nižu efikasnost (dominirane) u odnosu na uL-FABP strategiju. Zbog toga je značajan ICER samo za uL-FABP. QALY za strategiju primene uL-FABP je za 1,43 QALY veći u odnosu na aktuelnu dijagnostičku metodu uz dodatni trošak od 8521,87\$. Dakle, ICER za uL-FABP u poređenju sa serumskim kreatininom je 5959,35\$ po jednom dodatnom QALY.

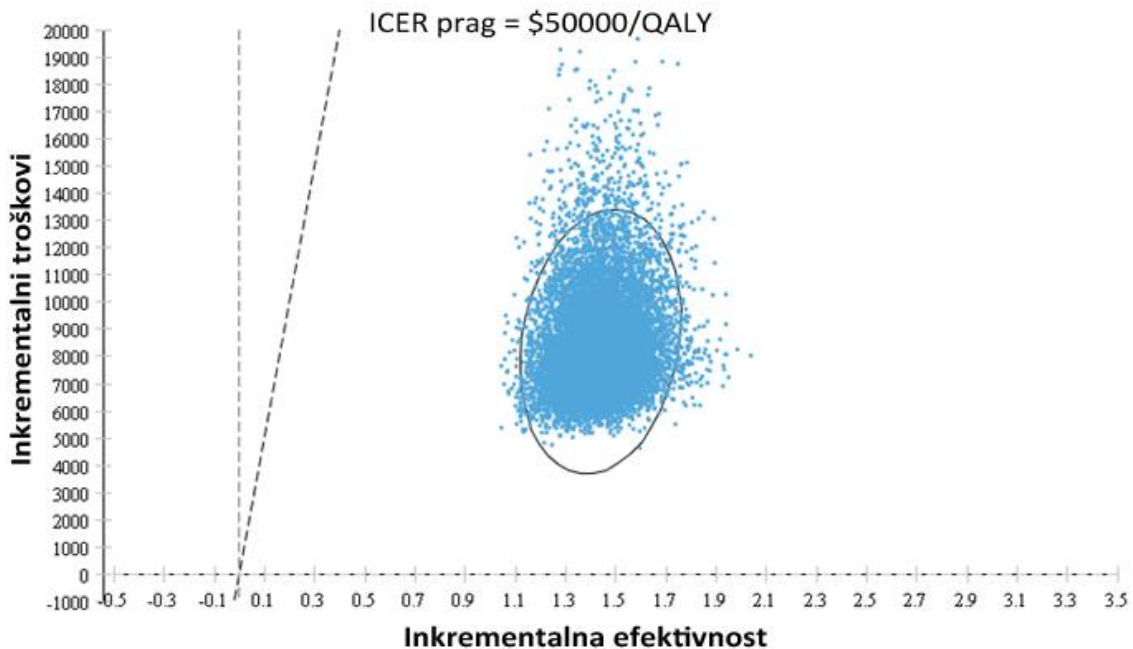
**Tabela 30.** Osnovna ICER analiza dijagnostičkih strategija primene biomarkera AOB u poređenju sa odrađivanjem koncentracije kreatinina u serumu

<b>Strategija</b>	<b>Troškovi (\$)</b>	<b>Inkrementalni troškovi (\$)</b>	<b>Efektivnost (QALY)</b>	<b>Inkrementalna efektivnost (QALY)</b>	<b>T/E (\$/QALY)</b>	<b>ICER (\$/QALY)</b>
<b>Kreatinin</b>	5607,50	-	3,78	-	1483,46	-
<b>uL-FABP</b>	14126,37	8521,87	5,21	1,43	2711,39	<b>5959,35</b>
<b>sCys C</b>	15303,57	9696,07	5,15	1,37	2971,57	7077,42
<b>uNGAL</b>	18462,65	12855,15	5,16	1,38	3578,03	9315,33



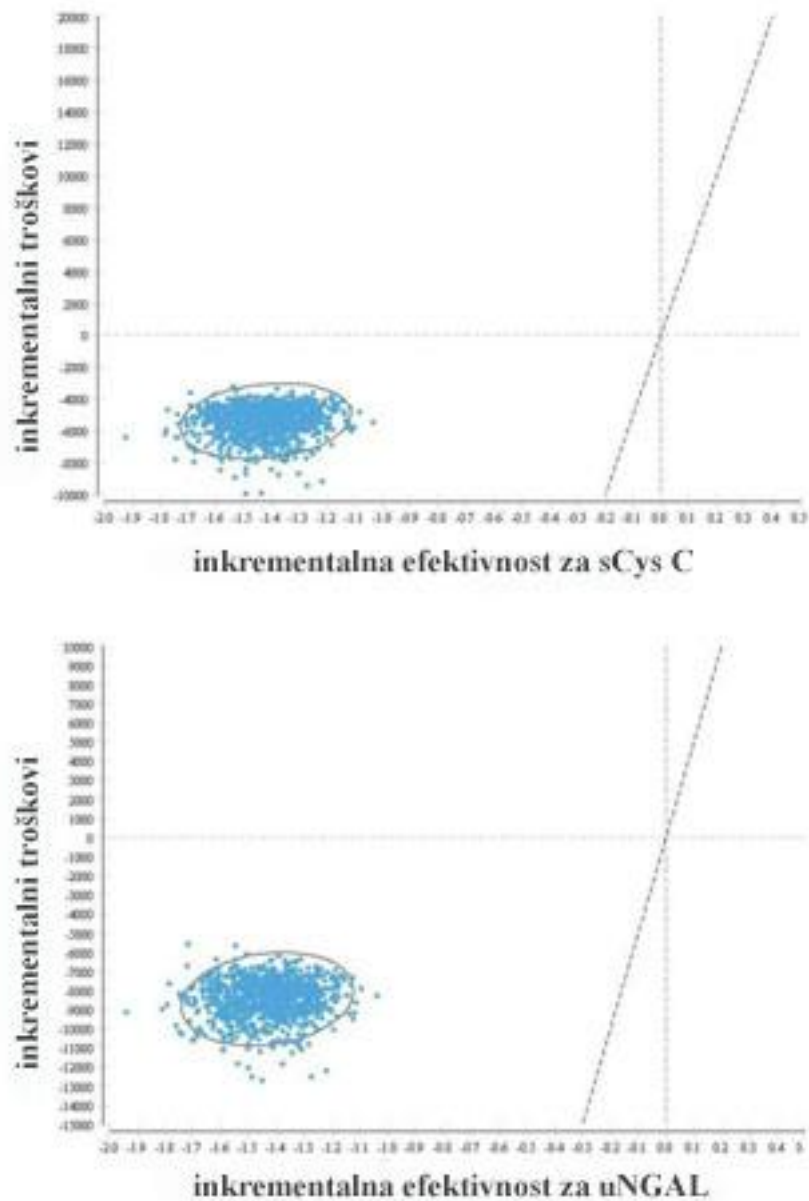
#### 4.2.4. Analiza osetljivosti

Probabilistička analiza osetljivosti je pokazala da je uL-FABP strategija isplativa za 10000 simulacija za primenjenu vrednost praga od 50000\$/QALY (slika 17). Na grafičkom prikazu (*scatterplot*) dijagonalna linija predstavlja definisani prag isplativosti od 50000\$/QALY. Sve ICER vrednosti dobijene nakon 10000 simulacija promena u troškovima, verovatnoćama i QALY vrednostima za uL-FABP strategiju su bile niže od vrednosti praga isplativosti (tačke ispod i desno u odnosu na dijagonalnu liniju).



**Slika 17.** ICER analiza strategije primene uL-FABP u odnosu na praćenje koncentracije kreatinina u serumu nakon 10000 simulacija u probabilističkoj analizi osetljivosti

Za druga dva analizirana biomarkera (sCys C i uNGAL) probabilistička analiza osetljivosti je pokazala da su ICER vrednosti bile više od praga isplativosti (tačke iznad i levo u odnosu na dijagonalnu liniju), (slika 18).



**Slika 18.** ICER analiza strategije primene sCys C i uNGAL u odnosu na praćenje koncentracije kreatinina u serumu nakon 10000 simulacija u probabilističkoj analizi osetljivosti

## **5. DISKUSIJA**

### **5.1. Biomarkeri AOB i parametri oksidativnog statusa kod dece sa IUT**

Sve novije pedijatrijske studije sprovedene tokom proteklih decenija pokazuju da se incidenca AOB kod dece značajno povećava, a etiologija AOB menja od primarnih bolesti bubrega ka različitim sistemskim oboljenjima ili njihovom lečenju, naročito kod kritično obolele hospitalizovane dece (20). Takođe, genetička predispozicija može učiniti neku decu sklonom ka razvoju AOB (10). Prognoza AOB u velikoj meri zavisi od etiologije ovog patološkog procesa.

Mogući uzrok za razvoj AOB je i teži oblik IUT, pogotovu kod dece jer u prve dve godine života bubrežna funkcija fiziološki sazreva. Kasna dijagnoza AOB i samim tim neblagovremena primena terapije može dovesti do povećane smrtnosti (12). Pored toga, postoje brojni dokazi da je rizik za razvoj HBB značajno uvećan kod pacijenata sa AOB (19). Međutim, aktuelne dijagnostičke procedure za AOB i praćenje eventualnih komplikacija imaju niz nedostataka. Kreatinin u serumu raste kasno u AOB patofiziologiji, kad je već došlo do značajnog oštećenja bubrega, a veliki deo kapaciteta za filtraciju izgubljen (7). Takođe, iako su nedavno uvedeni sistemi klasifikacije AOB AKIN (12) i pRIFLE (13) korisni za retrospektivna ispitivanja i epidemiološke studije, oni imaju ograničenu upotrebu za lekare u proceni stanja dece u svakodnevnoj kliničkoj praksi (15). Sa druge strane, scintigrafija bubrega je invazivna i skupa dijagnostička tehnika koja nije uvek dostupna, pa je stoga neophodno raditi na pronalaženju novih neinvazivnih i pristupačnih metoda (29).

Zato su poslednjih decenija aktuelna ispitivanja biomarkera koji odražavaju promenu bubrežne funkcije u akutnim stanjima, čime bi bila omogućena brza i pouzdana dijagnoza AOB. Dobar biomarker AOB bi trebalo da bude neinvazivan, da se može odrediti iz pristupačnih uzoraka kao što su krv i urin, merljiv korišćenjem standardizovanih testova sa brzim rezultatima i prihvatljivim troškovima (42). Takođe, važno je da se njihove vrednosti menjaju samo zbog oštećenja bubrega, a ne zbog infekcije, inflamacije i drugih uzroka. Shodno tome, kako bi se obezbedila adekvatna klinička primena biomarkera i interpretacija

rezultata neophodna je njihova sistematska procena u različitim kliničkim stanjima sa AOB. Osim toga, malo je verovatno da će jedan biomarker dosledno obezbediti dovoljnu preciznost za blagovremenu dijagnozu AOB u svim kliničkim stanjima, tako da se kombinacijom biomarkera mogu formirati paneli za specifične bolesti ili se može povećati tačnost (15).

Uzimajući u obzir podatke koji su navedeni, cilj istraživanja je bio da se ispita da li bi primena novih biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa doprinela proceni dužine trajanja inflamacije i razvoja AOB kod dece tokom IUT. Prvi korak je bio da se ispita stabilnost ovih parametara u stanjima akutne infekcije, zbog čega su praćene promene KIM-1, uNGAL, sNGAL, TOS, TAS i OSI u odnosu na stanje inflamacije i razvoj AOB. Nakon toga je ispitana dijagnostička mogućnost ovih parametara u skriningu razvoja AOB i dužine trajanja inflamacije kod dece sa IUT.

Od analiziranih biomarkera AOB, vrednosti uNGAL su bile značajno više u vreme prijema u bolnicu od odgovarajućih vrednosti u vreme otpusta iz bolnice, kao i kod pacijenata sa dužim trajanjem inflamacije u odnosu na pacijenate sa kraćim trajanjem inflamacije, tako da su rezultati ove studije potvrdili da je uNGAL osetljiv na stanje infekcije. Prema podacima iz literature, uNGAL i njegova normalizovana vrednost uNGAL/kreatinin mogu se koristiti kao osetljivi markeri za rano otkrivanje IUT u odsustvu AOB i HBB (91). Tokom infekcije NGAL oslobađaju aktivirani neutrofilni, čime sprečavaju apsorpciju gvožđa i na taj način smanjuju rast bakterija (155, 156). Dakle, ekspresija NGAL raste kao deo imunog odgovora u cilju uklanjanja bakterija u ranoj fazi infekcije (91). Takođe, koncentracija uNGAL je povećana u AOB uzrokovanom dejstvom nefrotoksina ili ishemije, verovatno zato što je ekspresija NGAL uvećana kako bi doprinela regeneraciji tkiva posle oštećenja bubrega (82, 83). Međutim, u ovom slučaju merenja NGAL mogu biti pod uticajem više koegzistirajućih varijabli, kao što je već postojeća bolest bubrega (85) i sistemske infekcije ili IUT (86, 87).

Sa druge strane, iako su vrednosti KIM-1 bile više u trenutku prijema u bolnicu od odgovarajućih vrednosti u vreme otpusta iz bolnice, KIM-1 nije pokazao značajno više vrednosti u grupi sa dužim trajanjem inflamacije u odnosu na grupu sa kraćim trajanjem inflamacije. Prema sistematizaciji koju je dao Herein za dijagnostičke i prognostičke

performanse nekoliko urinarnih biomarkera AOB, KIM-1 nije uključen u grupu inflamatornih markera za dijagnozu AOB, za razliku od NGAL i IL-18 (157).

Pored toga, u ovoj studiji je ispitano da li bi analizirani biomarkeri AOB sami ili u kombinaciji sa tradicionalnim parametrima inflamacije bili uspešni u detekciji dužeg trajanja inflamacije. Od analiziranih parametara KIM-1, uNGAL, sNGAL, kreatinina i ureje, samo je broj leukocita imao statistički ali ne i klinički značajnu dijagnostičku sposobnost u detekciji dužeg trajanja inflamacije (AUC=0,688, P=0,047). Takođe, istražena je i potencijalna korist od dodavanja parametara bubrežne funkcije broju leukocita u cilju boljeg razdvajanja pacijenata sa dužim trajanjem inflamacije. Dodatak kreatinina (AUC=0,723, P=0,027) i ureje (AUC=0,762, P=0,009) povećao je dijagnostičku sposobnost za broj leukocita, dok je dodavanje uNGAL imalo marginalni efekat (AUC=0,695, P=0,041), (slika 12, paneli A i B). Bazalne vrednosti uNGAL nisu pokazale sposobnost za detekciju dece koja će imati duže trajanje inflamacije u odnosu na decu sa kraćim trajanjem inflamacije. Do sada nisu objavljene studije koje su proučavale uspešnost novih biomarkera AOB u detekciji dužeg trajanja inflamacije.

Za sada je poznato da je ekspresija KIM-1 povećana u AOB različite etiologije, HBB, nakon transplantacije bubrega, i u slučaju karcinoma bubrega (158). Prethodna istraživanja su pokazala da je normalizovana vrednost KIM-1 bila značajno viša kod bolesnika sa ishemijskom ATN u odnosu na bolesnike sa drugim oblicima AOB ili HBB (97), a takođe i kod pacijenata sa AOB u odnosu na pacijente sa IUT (96). Međutim, dosadašnje studije nisu uspele da definišu cut off vrednost koja bi se koristila za dijagnozu AOB (158). Osim toga, za sad nije sasvim jasno da li se ekspresija KIM-1 odnosi na patogenezu samog oštećenja bubrega ili je KIM-1 marker regeneracije oštećenog tkiva. Takođe, KIM-1 je jedinstven molekul i po tome što pretvara epitelne ćelije proksimalnih tubula u semiprofesionalne fagocite (101). Kao posledica njegove uloge u poboljšanju klirensa mrtvih ćelija preostalim preživelim tubularnim ćelijama, može se pretpostaviti da KIM-1 modulira imunološki odgovor tokom AOB i fagocitozom ćelija apoptoze može nishodno regulisati proinflamatorni imunološki odgovor (95).

U ovom istraživanju testirana je hipoteza da se povećana urinarna ekskrecija KIM-1 kod dece sa IUT odnosi na oštećenje bubrega. Ispitana je mogućnost ovog proteina kao

potencijalnog biomarkera za dijagnozu AOB u prisustvu IUT. Rezultati sprovedene studije pokazuju značajnu razliku u izlučivanju KIM-1 urinom među grupama sa AOB i bez AOB (slika 16), ali bazalne vrednosti KIM-1 u vreme prijema u bolnicu nisu pokazale sposobnost da razdvoje ove dve grupe ispitanika ( $AUC=0,620$ ,  $P=0,175$ ). Diskriminaciona sposobnost KIM-1 za AOB bila je manja od tradicionalnog parametra ureje ( $AUC=0,681$ ,  $P=0,040$ ). Kombinacija KIM-1 sa urejom povećala je sposobnost ureje da detektuje povećan rizik za razvoj AOB ( $AUC=0,705$ ,  $P=0,023$ ), (slika 15).

Do sada je objavljen mali broj kliničkih studija sa KIM-1, tako da za sada ne postoji jasan dokaz da li je KIM-1 efikasan dijagnostički test za razvoj AOB kod ljudi (158). Ranije studije koje su sprovedene na populaciji odraslih osoba sugerišu da KIM-1 može poslužiti za razdvajanje pacijenata sa različitim tipovima ATN od onih bez AOB (109, 159). Ovo je prva studija u kojoj je KIM-1 razmatran kao biomarker za detekciju AOB kod dece sa IUT. Do sada je KIM-1 uglavnom ispitivan kao biomarker za AOB u drugim kliničkim stanjima. Pedijatrijska studija na 40 dece koja su podvrgnuta kardiohirurškoj intervenciji utvrdila je da je KIM-1 u 12h postoperativno imao AUC vrednost 0,83 za detekciju AOB (159). Sličan rezultat tačnosti KIM-1 za ranu detekciju AOB utvrđenom u ovom istraživanju, dobijen je u studiji koja je obuhvatila 252 dece (prosečne starosti  $11,4 \pm 4,8$  godina) sa različitim primarnim dijagnozama. U ovoj studiji, AUC vrednost za KIM-1 u predviđanju AOB je bila 0,61 (95% IP 0,48-0,73) (160). U studiji Du i sar. (160) pacijenti su bili podeljeni prema pRIFLE sistemu klasifikacije AOB i KIM-1 je ispoljio višu AUC vrednost za predviđanje pRIFLE-I AOB nego za predviđanje pRIFLE-R AOB. Prema ovim rezultatima, KIM-1 može poslužiti kao biomarker AOB u slučaju težih oboljenja.

Za sada, ne bi trebalo potpuno isključiti KIM-1 kao potencijalni biomarker za AOB u pedijatrijskoj populaciji sa IUT. Za analizu KIM-1 kao uzorak se koristi urin umesto krvi, što je posebno korisno u pedijatriji, a pored toga trenutno je aktuelan razvoj brzih skrining urin traka. U tom smislu treba razmotriti sprovođenje sveobuhvatne studije kojom bi se ispitala negativna prediktivna vrednost KIM-1 za razvoj AOB tokom IUT i formirao algoritam kojim bi se u velikoj meri olakšao rad pedijatara.

Pored toga, danas je dobro poznato da oksidativni stres ima važnu ulogu u patogenezi bolesti bubrega. Iz tog razloga u ovom istraživanju je testirana hipoteza da je oštećenje bubrega tokom IUT povezano sa inflamacijom i povećanom produkcijom slobodnih kiseoničnih radikala u krvi. Shodno tome, cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi ukupan prooksidantni i antioksidativni kapacitet dece sa IUT merenjem parametara TOS, TAS i OSI, kao i njihove promene u skladu sa stanjem akutne inflamacije i AOB. U ovoj studiji je analizirana promena vrednosti parametara oksidativnog statusa kod dece sa IUT, uzimajući u obzir trajanje inflamacije i rizik za nastanak AOB. Do sada, nisu objavljeni podaci o parametrima oksidativnog statusa kao što su TAS, TOS i OSI kod dece sa IUT. U ovom istraživanju je pokazano da su se parametri TAS i OSI menjali u zavisnosti od trajanja inflamacije, dok je samo OSI odrazio promene u oksidativno-antioksidantom balansu pacijenata pri otpustu iz bolnice. Međutim, nijedan od ispitivanih parametara se nije menjao u odnosu na akutne promene funkcije bubrega.

Kao što se vidi iz dve tačke merenja (u trenutku prijema u bolnicu i u vreme otpusta iz bolnice), TAS vrednosti su povećane, a TOS vrednosti umanjene kod dece tokom otpusta iz bolnice, ali te razlike nisu bile značajne. Međutim, prilikom određivanja OSI, promene u oba parametra TAS i TOS postaju očigledne. Ovo je još jedan dokaz da u nekim patološkim stanjima korišćenje indeksa koji kombinuju faktore sa različitim efektima (npr. apoB/apoA indeks, LDL/HDL indeks, itd.) može biti pogodnije za procenu bolesti.

Pošto inflamatorni proces prati infekcije, najpre je ispitano da li postoje promene parametara oksidativnog statusa u odnosu na trajanje inflamacije. U kliničkoj praksi se za procenu inteziteta inflamacije tokom IUT primenjuje određivanje CRP kao direktnog kvantitativnog markera reakcije akutne faze. Dugotrajno visoke koncentracije CRP ukazuju na prolongirano zapaljenje koje može dovesti do razvoja fibroze i formiranja ožiljaka u bubregu (29). Visok stepen korelacije između koncentracije CRP u serumu i patoloških nalaza dobijenih primenom scintigrafije bubrega utvrđen je u studiji Stokland i sar. (27), na osnovu čega je u ovoj studiji primenjena indirektna metoda procene stepena inflamacije renalnog parenhima.

U ovom istraživanju bazalne vrednosti TAS su bile više kod pacijenata sa dužim trajanjem inflamacije, što je potvrđeno merenjem koncentracije CRP u vreme otpusta iz

bolnice. Mogući razlog za to može biti da iako serum sadrži različite antioksidantne molekule, proteini predstavljaju glavnu antioksidantnu komponentu. Slobodne sulfhidrilne grupe proteina su uglavnom odgovorne za njihov antioksidativni efekat. Primenom Erel-ove metode je utvrđeno da ukupni proteini učestvuju sa 52,9% u izmerenim vrednostima TAS u serumu kod zdravih osoba, (130). Sa druge strane, dobro je poznata činjenica da je inflamatorni odgovor praćen promenama u ekspresiji proteina akutne faze (29). Shodno tome, više vrednosti TAS u stanjima produženog trajanja inflamacije nisu iznenađujuće.

Osim toga, ispitano je da li dolazi do promena u parametrima oksidativnog statusa u zavisnosti od oštećenja bubrega. Međutim, nije dokazano da su se parametri oksidativnog statusa značajno razlikovali kod dece sa AOB u odnosu na decu bez AOB. Studija Psotova i sar. koja je uključila odrasle osobe sa HBB, a kojima su mereni određeni parametri (TAS, kreatinin, ureja, mokraćna kiselina) pre i posle dijalize, pokazala je da smanjenje TAS vrednosti posle dijalize uglavnom odgovara smanjenju niskomolekularnih supstanci kreatinina, ureje i mokraćne kiseline (161). Značajno smanjenje TAS vrednosti posle dijalize je takođe utvrđeno kod pedijatrijskih pacijenata tokom hemodijalize (162). U ovoj studiji, TAS nije odrazio promene u koncentraciji antioksidativnih supstanci osetljivih na bubrežnu funkciju.

Takođe, neophodno je uzeti u obzir da su mnoge farmakološke eksperimentalne studije ispitivale uticaj primene radikalskih sakupljača i vitamina antioksidanata (163-165), anti-inflamatornih lekova (166), naročito inhibitora ciklooksigenaze (167), i kombinacije ovih agenasa (163), pored klasičnih protokola tretmana antibioticima, na sprečavanje formiranje ožiljaka u bubrezima (168). Neophodno je sprovođenje novih studija kako bi se ispitaio potencijalni značaj TAS, TOS i OSI, kao parametara za selekciju pacijenata koji bi bili kandidati za primenu dodatne terapije pored antibiotika u cilju sprečavanja eventualnih komplikacija tokom IUT. Tako je npr. studija na deci sa primarnim nefrotskim sindromom pokazala da TAS vrednosti mogu predvideti odgovor na kortikosteroide u vreme postavljanja dijagnoze, a TAS vrednosti posle prestanka primene kortikosteroida mogu predvideti da li će pacijenti imati recidiv ili ne (169).

U ovom istraživanju procena oksidativnog stresa tokom IUT kod pedijatrijskih pacijenata, vršena je merenjem koncentracije parametara TOS i TAS jednostavno i uz



manji utrošak finansijskih sredstava primenom metoda po Erelu (128, 130), a računata OSI vrednost primenom matematičke operacije deljenje za dobijene vrednosti TOS i TAS. Detaljnija ispitivanja su potrebna kako bi se procenila opravdanost uključivanja parametara TOS, TAS i OSI u spektar analiza rutinskih biohemijskih laboratorija u cilju unapređenja rada pedijatara.

Ograničenje ove studije je mali broj ispitanika, a samim tim mali broj pacijenata u grupi sa AOB i bez AOB, kao i odsustvo kontrolne grupe. Međutim, zbog dizajna studije formiranje kontrolne grupe nije bilo neophodno. Takođe, samo indirektno je procenjen stepen inflamacije renalnog parenhima, nasuprot direktnoj proceni snimanjem gornjeg urinarnog trakta primenom scintigrafije, za koju je pokazano da je veoma precizna u proceni inflamatornog oštećenja renalnog parenhima u direktnom poređenju sa histopatologijom. Analiza veze između parametara oksidativnog statusa i direktne procene inflamacije bubrega i kasnijeg formiranja ožiljka primenom scintigrafije, doprinela bi nalazima ove studije. Međutim, nedostatak podataka koji se dobijaju scintigrafijom bubrega nije kritičan, jer je glavni cilj ove studije bio da se ispita stabilnost novih biomarkera AOB i parametara oksidativnog statusa u stanju inflamacije kod dece sa IUT. Buduće studije bi trebalo da uključe direktno praćenje akutne inflamacije, veći broj pacijenata, dok bi podaci kontrolne grupe omogućili definisanje referentnih opsega za ove parametre.

## **5.2. Ekonomska analiza primene biomarkera AOB kod dece u kardiohirurgiji**

Veliki izazov u kliničkoj praksi na odeljenjima intenzivne nege u pedijatrijskoj kardiohirurgiji je blagovremena identifikacija pacijenata koji imaju visok rizik za razvoj AOB, sa ciljem rane intervencije ili modifikacije terapije kako bi se preveniralo ili ublažilo oštećenje bubrega (170). Nedavno otkriće specifičnih bubrežnih biomarkera je otvorilo mogućnost da se dijagnoza AOB postavi znatno ranije u odnosu na aktuelnu dijagnostičku proceduru. Međutim, ekonomski značaj dijagnostičkih strategija zasnovanih na primeni biomarkera AOB u pedijatrijskoj kardiohirurgiji do sada nije poznat.

Prema podacima iz literature, kod pedijatrijskih pacijenata sa kongenitalnim srčanim bolestima razvoj AOB je usledio brzo nakon kardiohirurške intervencije, više od polovine pacijenata (53%) razvija AOB tokom prvih 24h, a čak 97,7% dece tokom 48h (32). Sa druge strane, koncentracije sCys C, uNGAL i uL-FABP mogu porasti već 2h posle kardiohirurške intervencije, a 24 do 48h pre serumskog kreatinina (138). Na osnovu toga, može se pretpostaviti da se njihovim merenjima može obezbediti brže dijagnostikovanje AOB i ranija primena preventivne terapije. Međutim, pored procene efikasnosti, postoji potreba da se izračunaju i troškovi novih dijagnostičkih strategija. Zbog toga je razvijen model kako bi se uporedila isplativost merenja sCys C, uNGAL i uL-FABP sa serumskim kreatininom za dijagnozu AOB kod dece u kardiohirurgiji.

Da bi se izračunali troškovi svih kliničkih ishoda za AOB, neophodno je najpre sagledati moguće dugoročne posledice AOB. Uticaj AOB na buduće zdravlje bubrega je zapravo tek nedavno prepoznato. Iako brojni dokazi ukazuju da je incidenca kako AOB tako i HBB kod dece u porastu i da se etiologija dramatično menja, relativno malo je poznato trenutno o progresiji AOB u HBB (171). Studija Mammen i sar. je pokazala da 10% pedijatrijskih pacijenata koji su imali AOB razvije i HBB tokom 1 do 3 godine praćenja, ali je skoro 50% pacijenata identifikovano sa rizikom za razvoj HBB (139). Osim toga, progresija HBB zavisi od osnovne bolesti, težine početnog oštećenja bubrega i prisustva dodatnih faktora rizika. Podaci iz Sjedinjenih Američkih Država [*North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies* (NAPRTCS)] na više od 4000 dece sa HBB stadijuma 2-4, pokazuju stopu napredovanja bubrežne bolesti do ESRD od 17% za 1 godinu i 39% za 3 godine posle registracije, sa srednjim vremenom progresije do ESRD od 4,5 godine (147). Takođe, stopa progresije HBB je obično veća tokom ranog detinjstva i puberteta. Iako pedijatrijski pacijenti sa ESRD čine veoma mali deo ukupne populacije sa ESRD, oni predstavljaju veliki izazov i obavezu za sve zdravstvene sisteme, jer se kod njih mora tretirati ne samo osnovno oboljenje bubrega, već i brojne ekstrarenalne manifestacije koje utiču na rast i razvoj (172). Međutim, klinički ishod dece sa uznapredovalom HBB u velikoj meri zavisi od finansijskih resursa zdravstvenog sistema svake države. U zemljama gde su dostupni različiti vidovi RRT, najviše primenjivani modalitet zamene bubrežne funkcije u pedijatriji je transplantacija u svim starosnim grupama. U Sjedinjenim

Američkim Državama kod 16% novodijagnostikovane dece sa ESRD transplantacija se primeni pre započinjanja primene bilo kog modaliteta RRT, a kod tri četvrtine dece transplantacija se sprovodi u roku od 3 godine od početka primene RRT (148). Među mladim osobama koje su počele sa primenom RRT tokom detinjstva, prosečan životni vek je 63 godine za one sa uspešno sprovedenom transplantacijom bubrega, u poređenju sa 38 godina za one koji su samo tretirani primenom dijalize (173). Ako se ovim dramatičnim podacima dodaju izuzetno visoki troškovi lečenja za AOB i HBB, jasno je da postoji potreba da se obezbedi bolji klinički ishod pacijenata sa AOB, kao i bolja raspodela finansijskih resursa u zdravstvenim sistemima.

Rezultati sprovedene ekonomske studije pokazuju da su analizirane dijagnostičke strategije zasnovane na primeni biomarkera za AOB isplative u odnosu na aktuelnu dijagnostičku metodu. Međutim, strategije bazirane na primeni uNGAL i sCysC su imale veće troškove i nižu efektivnost (dominirane) u odnosu na uL-FABP strategiju. Zbog toga je značajan ICER samo za uL-FABP. Strategija primene uL-FABP povećava QALY za 1,43 u odnosu na aktuelnu dijagnostičku metodu uz dodatni trošak od 8521,87\$. Dakle, ICER za uL-FABP u poređenju sa serumskim kreatininom je 5959,35\$/QALY, što je znatno niže u odnosu na navedeni prag 50000\$/QALY. Stoga, ovi rezultati ukazuju na to da bi upotreba uL-FABP predstavljala ekonomski najpovoljniju strategiju za rano otkrivanje AOB kod dece tokom kardiohirurških intervencija. Viša cena za uL-FABP test u odnosu na serumski kreatinin, pa čak i sCys C i uNGAL testove, je u potpunosti kompenzovana boljim dijagnostičkim karakteristikama (osetljivost i specifičnost) uL-FABP za rano otkrivanje AOB, koje će omogućiti pravovremeno i efikasnije lečenje pacijenata sa AOB. To bi dovelo do znatnog poboljšanja ishoda pacijenata sa AOB i dugoročne uštede finansijskih sredstava u zdravstvu.

Do sada je sprovedeno malo ekonomskih studija koje su ispitivale isplativost primene novih biomarkera u cilju unapređenja dijagnostike AOB. U studiji Shaw i sar. (53) primenjena je analiza TE za poređenje strategije primene uNGAL u odnosu na određivanje kreatinina kod osobe muškog pola starosti 67 koja je podvrgnuta kardiohirurškoj intervenciji sa primenom CPB. Prema rezultatima ove studije, primena uNGAL se pokazala kao troškovno isplativa, a razlika između troškova i QALY se uvećavala kako su se efekti

tretmana povećavali. Pošto je ovo prva studija koja je ispitivala isplativost primene sCys C i uL-FABP nije moguće uraditi poređenje rezultata za ove dijagnostičke strategije. Razlika između ove i studije Shaw i sar. (53) je u studijskoj populaciji i ispitivanim biomarkerima. Kod dece koja se podvrgavaju kardiohirurškim intervencijama proučavanje biomarkera AOB je neopterećeno uticajem komorbiditeta koji inače otežavaju slične studije kod odraslih, kao što su dijabetes, hronična hipertenzija i ateroskleroza.

Analiza osetljivosti je izvedena kako bi se proverilo da li promene u vrednostima promenljivih utiču na zaključak. Na ovaj način, varirani su podaci za incidencu razvoja AOB u kardiohirurgiji i pratećeg mortaliteta jer se ovi podaci znatno razlikuju između studija, pre svega zbog različitih kriterijuma koji su korišćeni za postavljanje dijagnoze AOB. Takođe su varirane i dijagnostičke karakteristike testova (osetljivost i specifičnost), jer je ova ekonomska analiza bazirana na rezultatima jedne studije, Peco i sar. (138). Korišćenje podataka o dijagnostičkim karakteristikama testova iz različitih studija nije adekvatno za ekonomsku analizu, jer su u studijama korišćeni testovi različitih proizvođača i stoga različitih cena. Zaključci studije su potvrđeni jer je uL-FABP strategija ostala dominantna za širok opseg vrednosti osnovnih varijabli (slika 17). Za razliku od uL-FABP strategije, posle primene analize osetljivosti ICER vrednosti za strategije sCys C i uNGAL su bile iznad postavljenog praga isplativosti (slika 18), čime je potvrđeno da je uL-FABP ekonomski najpovoljnija strategija.

Pri razmatranju potencijalne primene uL-FABP za ranu dijagnozu AOB u kardiohirurgiji treba napomenuti i sledeće: urin kao uzorak ima nekoliko prednosti u dijagnostici, uključujući i neinvazivnost prikupljanja samog uzorka, što je veoma važno u pedijatriji. Osim toga, uL-FABP se može takođe koristiti za predviđanje stepena jačine AOB, jer omogućava razdvajanje kategorija "R" i "težih oblika AOB" (138). Takođe, uL-FABP pokazuje visok stepen korelacije sa vremenom primene CPB i klemovanja arterije [aorta clamp (AC)], i RACHS (*risk adjustment for congenital heart surgery*) skorom, promenama u koncentraciji serumskog kreatinina 2h posle operacije (138). Dakle, preporuka bi bila razvoj algoritma kojim bi se na osnovu kliničkih parametara (starosti pacijenta, CPB i AC vremena, RACHS vrednosti) poboljšala procena rizika za razvoj AOB.

Na osnovu visokog skora u ovom algoritmu i povećanih vrednosti uL-FABP u 2h posle operacije mogla bi se izvršiti selekcija pacijenata kod kojih lečenje treba odmah započeti.

Rezultati ove studije ističu značaj efikasnih dijagnostičkih testova, kojim bi se precizno razdvajali pacijenti sa AOB kod kojih bi rana intervencija ili modifikacija terapije ublažila teško i trajno oštećenje bubrega, za razliku od pacijenata koji ne bi imali korist od primene terapije. Jasno je da rana dijagnostika AOB zahteva dobar i povoljan skrining test sa visokom osetljivošću i malim procentom LN rezultata, jer je važno da se ne propusti ni jedna obolela osoba (46). Pored toga, važno je da primenjena analiza obezbeđuje brze i tačne rezultate. U tom kontekstu, za razliku od NGAL i Cys C biomarkera za koje su već razvijeni brzi [*point-of-care* (POC)] testovi, L-FABP biomarker još nema mogućnost ove vrste analize. Razvoj POC testa za uL-FABP je poželjno, jer ovi testovi imaju nekoliko prednosti. Osnovna prednost POC testova je njihova sposobnost da omoguće brze rezultate i na taj način obezbede raniji tretman (174). Ostale prednosti uključuju to što se uzorak ne mora posebno pripremati za analizu i manje količine uzorka potrebnih za testiranje, što može biti posebno korisno u pedijatriji.

Pošto je AOB čest sporedni efekat i drugih medicinskih procedura, npr. tokom transplantacije bubrega ili kao posledica primene nefrotoksičnih agenasa kao što su kontrasti ili cisplatin, verovatno bi primena biomarkera unapredila dijagnostiku AOB i dodatno smanjila troškove i u ovim kliničkim stanjima, ali to bi se moralo dokazati u posebno dizajniranim studijama.

Ova ekonomska analiza takođe može pružiti važne informacije i za dalja farmakološka istraživanja. Rezultati u ovoj oblasti bi svakako doprineli boljem ishodu pacijenata sa AOB i omogućili značajnu uštedu finansijskih sredstava u odnosu na primenu skupe dijalize. Do sada postoje ohrabrujući rezultati u vidu primene visokih doza fenoldopama, selektivnog agoniste dopamin-1 receptora, koji pozitivno utiče na bubrežnu funkciju i perfuziju organa kod novorođenčadi tokom primene CPB (141).

Glavno ograničenje ovog istraživanja je sama metoda korišćena za određivanje koncentracije biomarkera (ELISA), jer ako govorimo o ranoj dijagnostici AOB, svakako nije poželjno da se rezultati analiza dobijaju nakon 6-7h. Pored toga, ova ekonomska analiza se zasniva na podacima o incidenci razvoja AOB u kardiohirurgiji i dijagnostičkim

karakteristikama testova za određivanje koncentracije novih biomarkera jedne studije. Međutim, u analizi osetljivosti je izvedeno čak 10000 simulacija, što znači da su sve uključene promenljive višestruko varirane. Takođe, u ekonomsku analizu su uključeni samo direktni medicinski troškovi, jer je studija sprovedena iz perspektive institucija koje finansiraju zdravstvo. Indirektni troškovi za HBB nisu uključeni u analizu.

## **6. ZAKLJUČAK**

- ❖ Iako se uNGAL može primeniti kao osetljiv marker za rano otkrivanje IUT u odsustvu AOB, bazalne vrednosti uNGAL se ne mogu koristiti za procenu dužeg trajanja inflamacije u cilju prognoze ishoda bolesti kod dece sa IUT.
- ❖ KIM-1 je manje osetljiv na stanje inflamacije od NGAL i samim tim više specifičan za ishemijsko oštećenje bubrega. Međutim, dijagnostička tačnost KIM-1 u detekciji razvoja AOB kod dece sa IUT nije zadovoljavajuća za kliničku primenu (AUC=0,620, P=0,175).
- ❖ Parametri TAS i OSI su se menjali u zavisnosti od trajanja inflamacije. Dakle, iz ovoga možemo zaključiti da su TAS i OSI kao markeri oksidativnog stresa osetljivi na prateće inflamatorno stanje.
- ❖ Nijedan od ispitivanih parametara oksidativnog stresa nije ispoljio osetljivost na akutne promene u funkciji bubrega.
- ❖ Odložena dijagnoza AOB sa serumskim kreatininom ne utiče samo na lošiji ishod pacijenata sa AOB, već i veću potrošnju finansijskih resursa zdravstvenih sistema. Upotreba uL-FABP predstavljala bi troškovno isplativu strategiju za rano otkrivanje AOB kod dece tokom kardiohirurških intervencija.
- ❖ Više cene za komercijalni uL-FABP test neće promeniti zaključak ovog istraživanja jer je analiza osetljivosti pokazala da značajne razlike u ceni testa neće uticati na ICER vrednost.

## **7. LITERATURA:**

1. Ležaić V. Serum and urinary biomarkers determination and their significance in diagnosis of kidney disease. *J Med Biochem* 2010;29:288–97.
2. Srisawat N, Hoste EE, Kellum JA. Modern classification of acute kidney injury. *Blood Purif* 2010;29:300–7.
3. NKF. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39:S1-266.
4. Locatelli F, Vecchio LD, Pozzoni P. The importance of early detection of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:2–7.
5. Ruggenti P, Schieppati A, Remuzzi G. Progression, remission, regression of chronic renal diseases. *Lancet* 2001;357:1601–8.
6. Hewitt SM, Dear J, Star RA. Discovery of protein biomarkers for renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1677-89.
7. Moran SM, Myers BD. Course of acute renal failure studied by a model of creatinine kinetics. *Kidney Int* 1985;27:928-37.
8. Bramham K, Mistry HD, Poston L, et al. The non invasive biopsy - will urinary proteomics make the renal tissue biopsy redundant. *QJ Med* 2009;102:523-38.
9. Kellum JA, Levin N, Bouman C, et al. Developing a consensus classification system for acute renal failure. *Curr Opin Crit Care* 2002;8:509-14.
10. Andreoli SP. Acute kidney injury in children. *Pediatr Nephrol* 2009;24:253– 63.
11. 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.
12. 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.



13. 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.
14. 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.
15. Basu RK, Wheeler D. Approaches to the Management of Acute Kidney Injury in Children. *Recent Patents on Biomarkers* 2011;1:49-59.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Vasarhelyi B, Toth-Heyn P, Treszl A, Tulassay T. Genetic polymorphism and risk for acute renal failure in preterm infants. *Pediatr Nephrol* 2005;20:132–5.
22. Nobilis A, Kocsis I, Toth-Heyn P, Treszl A, Schuler A, Tulassay T, Vásárhelyi B. Variance of ACE and AT1 receptor genotype does not influence the risk of neonatal acute renal failure. *Pediatr Nephrol* 2001;16:1063–6.
23. Fekete A, Treszl A, Toth-Heyn P, Vannay A, Tordai A, Tulassay T, Vásárhelyi B. Association between heat shock protein 72 gene polymorphism and acute renal failure in neonates. *Pediatr Res* 2003;54:452–5.
24. Rushton HG. Urinary tract infections in children. Epidemiology, evaluation, and management. *Pediatr Clin North Am* 1997;44:1133–69.

25. Jacobson SH, Eklof O, Eriksson CG, Lins LE, Tidgren B, Winberg J. Development of hypertension and uraemia after pyelonephritis in childhood: 27 year follow up. *BMJ* 1989; 299:703–6.
26. Ajdinović B, Krstić Z, Dopuđa M, Jauković Lj. Statička scintigrafija bubrega kod dece sa infekcijom urinarnog trakta. *Vojnosanit Pregl* 2005;62:745–749.
27. Stokland E, Hellstrom M, Jacobsson B, Jodal U, Lundgren P, Sixt R. Early 99mTc dimercaptosuccinic acid (DMSA) scintigraphy in symptomatic first-time urinary tract infection. *Acta Paediatr* 1996;85:430–6.
28. American Academy of Pediatrics, Committee on Quality Improvement, Subcommittee on Urinary Tract Infection: The diagnosis, treatment and evaluation of the initial urinary tract infection in febrile infants and young children. *Pediatrics* 1999;103:843-52.
29. Andersson L, Preda I, Hahn-Zoric M, et al. Urinary proteins in children with urinary tract infection. *Pediatr Nephrol* 2009;24:1533–8.
30. Sethi SK, Goyal D, Yadav DK, et al. Predictors of acute kidney injury post-cardiopulmonary bypass in children. *Clin Exp Nephrol* 2011;15:529–34.
31. Blinder JJ, Goldstein SL, Lee VV, Baycroft A, Fraser CD, Nelson D, Jefferies JL. Congenital heart surgery in infants: effects of acute kidney injury on outcomes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;143:368–74.
32. Li S, Krawczeski CD, Zappitelli M, et al. TRIBE-AKI Consortium: incidence, risk factors, and outcomes of acute kidney injury after pediatric cardiac surgery: a prospective multicenter study. *Crit Care Med* 2011;39:1493–9.
33. Morgan CJ, Zappitelli M, Robertson CM, et al. Western Canadian Complex Pediatric Therapies Follow-Up Group. Risk factors for and outcomes of acute kidney injury in neonates undergoing complex cardiac surgery. *J Pediatr* 2012;162:120–7.
34. 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.

35. Edelstein C, Faubel S. Biomarkers in Acute Kidney Injury. In: Edelstein C (eds) Biomarkers in Kidney Disease, 1st edn. Elsevier Inc, Burlington, USA, 2010; pp 177-232.
36. Stevens LA, Lafayette RA, Perrone RD, Levey AS. Laboratory evaluation of kidney function. In: Schrier RW, editor. Diseases of the Kidney and Urinary Tract. 8th edn. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2007;pp 299-336.
37. Vasiliades J. Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine: Kinetics and mechanism of formation of the non creatinine picric acid complex. Clin chem 1976;22:1664-71.
38. Star RA. Treatment of acute renal failure. Kidney Int 1998;54:1817-31.
39. Cockcroft D, Gault MK. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 1976;16:31-41.
40. Levey AS, Greene T, Kusek JW. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. J Am Soc Nephrol 2000;11:A0828.
41. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther 2001;69:89-95.
42. Al-Ismaili Z, Palijan A, Zappitelli M. Biomarkers of acute kidney injury in children: discovery, evaluation, and clinical application. Pediatr Nephrol 2011;26:29-40.
43. Devarajan P. Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury. Semin Nephro 2007;27:637-51.
44. Bennett MR, Devarajan P. Characteristics of an Ideal Biomarker of Kidney Diseases. In: Edelstein C (eds) Biomarkers in Kidney Disease, 1st edn. Elsevier Inc, Burlington, USA, 2010; pp 1-24.
45. Dos Remedios CG, Liew CC, Allen PD, et al. Genomics, proteomics and bioinformatics of human heart failure. J Muscle Res Cell Motil 2003;24:251-60.
46. Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. Science 1998;240:1285.
47. van Stralen KJ, Stel VS, Reitsma JB, Dekker FW, Zoccali C, Jager KJ. Diagnostic methods I: sensitivity, specificity, and other measures of accuracy. Kidney Int 2009;75:1257-63.

48. Dasta JF, Kane-Gill SL, Durtschi AJ, et al. Costs and outcomes of acute kidney injury (AKI) following cardiac surgery. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:1970–74.
49. Korkeila M, Ruokonen E, Takala J. Costs of care, long-term prognosis and quality of life in patients requiring renal replacement therapy during intensive care. *Intensive Care Med* 2000;26:1824–31.
50. Chertow GM, Burdick E, Honour M, et al. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3365-70.
51. Hoste EA, Schurgers M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem? *Crit Care Med* 2008;36(4 Suppl):S146-51.
52. Schiff H, Lang SM. Update on biomarkers of acute kidney injury moving closer to clinical impact? *Molecular diagnosis and therapy* 2012;16:199-207.
53. Shaw AD, Chalfin DB, Kleintjens J. The Economic Impact and Cost-Effectiveness of Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin After Cardiac Surgery. *Clin Ther* 2011;33:1713–25.
54. Han WK, Bonventre JV. Biologic markers for the early detection of acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care* 2004;10:476–82.
55. Butler EA, Flynn FV. The occurrence of postgamma protein in urine: a new protein abnormality. *J Clin Path* 1961;14:172-8.
56. Abrahamson M, Alvarez Fernandez M, Nathanson CM. Cystatins. *Biochem Soc Symp* 2003;70:179-99.
57. Grubb A. Cystatin C - properties and use as diagnostic marker. *Adv Clin Chem* 2000;35:63-99.
58. Westhuyzen J. Cystatin C: a promising marker and predictor of impaired renal function. *Ann Clin Lab Sci* 2006;36:387-94.
59. Simonsen O, Grubb A, Thysell H. The blood serum concentration of cystatin C as a measure of the glomerular filtration rate. *Scand J Clin Lab Invest* 1985;45:97-101.
60. Vinge E, Lindergard B, Nilsson Ehle P, et al. Relationships among serum cystatin C, serum creatinine, lean tissue mass and glomerular filtration rate in healthy adults. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:1-6.

61. Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta analysis. *Am J Kidney Dis* 2002;40:221-6.
62. Roos JF, Doust J, Tett SE, et al. Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children - a meta analysis. *Clin Biochem* 2007;40:383-91.
63. Herget Rosenthal S, Marggraf G, Husing J, et al. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int* 2004;66:1115-22.
64. Herrero Morin JD, Malaga S, Fernandez N, et al. Cystatin C and beta-2 micro globulin: markers of glomerular filtration in critically ill children. *Crit Care* 2007;11:R59.
65. Grubb A, Lindstrom V, Kristensen K, et al. Filtration quality: a new measure of renal disease. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(Suppl):S273-4.
66. Manetti L, Pardini E, Genovesi M, et al. Thyroid function differently affects serum cystatin C and creatinine concentrations. *J Endocrinol Invest* 2005;28:346-9.
67. Risch L, Huber AR. Glucocorticoids and increased serum cystatin C concentrations. *Clin Chim Acta* 2002;320:133-4.
68. 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;65:1416-21.
69. Levey AS, Coresh J, Greene T, et al. Chronic kidney disease epidemiology collaboration. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2006;145:247-54.
70. Blirup Jensen S, Grubb A, Lindstrom V, et al. Standardization of cystatin C: Development of primary and secondary reference preparations. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;68(Suppl. 241):67-70.
71. Grubb A. Non invasive estimation of glomerular filtration rate (GFR). The lund model: Simultaneous use of cystatin C and creatinine based GFR prediction

- equations, clinical data and an internal quality checks. *Scand J Clin Lab Invest* 2010;70:65-70.
72. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N. Structural and functional heterogeneity among peroxidase negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood* 1993;82:3183–91.
  73. Kjeldsen L, Sengelov H, Lollike K, et al. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1993;268:10425-32.
  74. Cowland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 1997;45:17-23.
  75. Xu SY, Carlson M, Engstrom A, Garsia R, Peterson CGB, Venge P. Purification and characterization of a human neutrophil lipocalin (HNL) from the secondary granules of human neutrophils. *Scand J Clin Lab Invest* 1994;54:365-76.
  76. Liu Q, Ryon J, Nilsen-Hamilton M. Uterocalin: a mouse acute phase protein expressed in the uterus around birth. *Mol Reprod Dev* 1997;46:507-14.
  77. Stoesz SP, Gould MN. Overexpression of neu-related lipocalin (NRL) in neu-initiated but not ras or chemically initiated rat mammary carcinomas. *Oncogene* 1995; 11:2233-41.
  78. Triebel S, Blaser J, Reinke H, Tschesche H. A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett* 1992; 314: 386-8.
  79. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem* 2001;276:37258-65.
  80. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-an emerging troponin for kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:3737–43.

81. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, et al. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 2002;10:1033-43.
82. Ichino M, Kuroyanagi Y, Kusaka M, et al. Increased urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin levels in a rat model of upper urinary tract infection. *J Urol* 2009;181:2326–31.
83. Hirsch R, Dent C, Pfriem H, et al. NGAL is an early predictive biomarker of contrast-induced nephropathy in children. *Pediatr Nephrol* 2007;22:2089–95.
84. Smidt-Ott KM. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury-where we do stand today? *Nephrol Dial Transplant* 2011;0:1-3.
85. Mitsnefes M, Kathman T, Mishra J, et al. Serum NGAL as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2007;22:101–8.
86. Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:1760–71.
87. Xu S, Venge P. Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochim Biophys Acta* 2000;482:298–307.
88. 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; 115:610-21.
89. Dent CL, Ma Q, Dastrala S, et al. Plasma NGAL predicts acute kidney injury, morbidity and mortality after pediatric cardiac surgery: a prospective uncontrolled cohort study. *Crit Care* 2007;11:R127.
90. Bennett M, Dent CL, Ma Q, et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:665-73.
91. Yilmaz A, Sevketoglu E, Gedikbasi A, et al. Early prediction of urinary tract infection with urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Pediatr Nephrol* 2009; 24:2387–92.

92. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V 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.
93. Amin RP, Vickers AE, Sistare F et al. Identification of putative gene based markers of renal toxicity. *Environ Health Perspect* 2004;112:465–79.
94. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:3265–8.
95. Bonventre JV, Yang L. Kidney injury molecule-1. *Curr Opin Crit Care* 2010;16:556–61.
96. Bailly V, Zhang Z, Meier W et al. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem* 2002;277:39739–48.
97. 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;62:237–44.
98. Bonventre JV. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(Suppl 1):S55–S61.
99. Sheridan AM, Bonventre JV. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9:427–434.
100. Han WK, Alinani A, Wu CL, et al. Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1126–34.
101. Ichimura T, Asseldonk EJ, Humpreys BD et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1) is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest* 2008;118:1657–68.
102. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;407:784–8.
103. Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, et al. TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury. *J Exp Med* 2010;207:1501–11.



104. Freeman GJ, Casasnovas J M, Umetsu DT, DeKruiff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2010;235:172–89.
105. Ichimura T, Hung CC, Yang SA et al. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F552–F63.
106. 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:F517–F29.
107. Zhou Y, Vaidya VS, Brown RP et al. Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium. *Toxicol Sci* 2008;101:159–70.
108. FDA News. FDA, European medicines agency to consider additional test results when assessing new drug safety collaborative effort by FDA and EMEA expected to yield additional safety data. *FDA News* 2008;12 June
109. van Timmeren MM, van den Heuvel MC, Bailly V, et al. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *J Pathol* 2007;212:209–17.
110. Chmurzynska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet* 2006;47:39–48.
111. Yamamoto T, Noiri E, Ono Y, et al. Renal L-type fatty acid-binding protein in acute ischemic injury. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2894–902.
112. Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, et al. Urinary excretion of fatty acid-binding protein reflects stress overload on the proximal tubules. *Am J Pathol* 2004;165:1243–55.
113. Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Obama A, et al. Liver type fatty acid-binding protein attenuates renal injury induced by unilateral ureteral obstruction. *Am J Pathol* 2006;169:1107–17.
114. Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Sekizuka A, Hirata K, Kimura K. Amelioration of diabetic tubulointerstitial damage in liver type fatty acid-binding protein transgenic mice. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:788–800.

115. Negishi K, Noiri E, Doi K, Maeda-Mamiya R, Sugaya T, Portilla D, Fujita T. Monitoring of urinary L-type fatty acid-binding protein predicts histological severity of acute kidney injury. *Am J Pathol* 2009;174:1154–9.
116. Wang G, Gong Y, Anderson J, Sun D, Minuk G, Roberts MS, Burczynski FJ. Antioxidative function of L-FABP in LFABP stably transfected Chang liver cells. *Hepatology* 2005;42:871–9.
117. Yokoyama T, Kamijo Ikemori A, Sugaya T, et al. Urinary excretion of liver type fatty acid binding protein accurately reflects the degree of tubulointerstitial damage. *Am J Pathol* 2009;174:2096-106.
118. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1503–20.
119. Haase M, Bellomo R, Haase-Fielitz A. Novel biomarkers, oxidative stress, and the role of labile iron toxicity in cardiopulmonary bypass associated acute kidney injury. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2024–33.
120. 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;73:465-72.
121. Ozbek E. Induction of Oxidative Stress in Kidney. *Int J Nephrol* 2012;2012:465897.
122. Kurutas EB, Ciragil P, Gul M, Kilinc M. The Effects of Oxidative Stress in Urinary Tract Infection. *Mediators of Inflammation* 2005;4:242–4.
123. Andreoli SP. Reactive oxygen molecules, oxidant injury and renal disease. *Pediatr Nephrol* 1991;5:733–42.
124. Sener G, Tugtepe H, Velioglu-Ogunc A, Cetinel S, Gedik N, Yegen BC. Melatonin prevents neutrophil-mediated oxidative injury in Escherichia coli-induced pyelonephritis in rats. *J Pineal Res* 2006;41:220–7.
125. Baud L, Nivez MP, Chansel D et al. Stimulation by oxygen radicals of prostaglandin production by rat renal glomeruli. *Kidney Int* 1981;20:34–42.
126. Shihamura T. Mechanisms of renal tissue destruction in an experimental acute pyelonephritis. *Exp Mol Pathol* 1981;34:34–42.
127. Monga M, Roberts JA. The possible role of granulocyte elastase in renal damage from acute pyelonephritis. *Pediatr Nephrol* 1995;9:583–6.

128. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38:1103–11.
129. Jozanov-Stankov O, Jovanka Duric J, Dobutovic B, Isenovic E. Determination of Total Antioxidative Status As A Biochemical Parameter In Control Of Worker's Health; Vinca Institute of Nuclear Sciences. *Arch. Biol. Sci.* 2009;61:375-82.
130. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004;37:277–85.
131. Langlois V. Laboratory evaluation at different ages. In: Geary DF, Schaefer F, eds. *Comprehensive Pediatric Nephrology*. Amsterdam: Mosby Elsevier; 2006;pp 42-3.
132. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499-511.
133. Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. *Pediatr Int* 2005;47:635-9.
134. Gold MR, Patrick DL, Torrance GW, et al. Cost-Effectiveness in Health and Medicine: Report of the Panel on Cost-Effectiveness in Health and Medicine. In: Gold MR, Siegel JE, Russell LB, Weinstein MC, editors. *New York, NY: Oxford University Press; 1996. Identifying and valuing outcomes.*
135. Naglak M, Mitchell DC, Kris-Etherton P, Harkness W, Pearson TA. What to consider when conducting a cost-effectiveness analysis in clinical settings. *J Am diet Assoc* 1998;98:1149-54.
136. Sonnenberg FA, Beck JR. Markov models in medical decision making: a practical guide. *Med Decis Making.* 1993;13:322-38.
137. National Institute for Health and Clinical Excellence. Guide to the methods of technology appraisal. [www.nice.org.uk](http://www.nice.org.uk)
138. Peco-Antic A, Ivanisevic I, Vulicevic I, et al. Biomarkers of acute kidney injury in pediatric cardiac surgery. *Clinical Biochemistry* 2013;46:1244–51.

139. Ricci Z, Luciano R , Favia I, et al. High-dose fenoldopam reduces postoperative neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cystatin C levels in pediatric cardiac surgery. *Critical care* 2011;15; article number R160.
140. Mammen C, Al Abbas A, Skippen P, et al. Long-term risk of CKD in children surviving episodes of acute kidney injury in the intensive care unit: a prospective cohort study. *Am J Kidney Dis.* 2012;59:523-30.
141. Cost-Effectiveness Analysis (CEA) registry. The Center for the Evaluation of Value and Risk in Health. The Institute for Clinical Research and Health Policy Studies. Tufts Medical Center. [www.research.tufts-nemc.org](http://www.research.tufts-nemc.org). [podaci preuzeti 10.03.2014].
142. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP). Kids' Inpatient Database (KID). (2009) Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, MD. [www.hcup-us.ahrq.gov/kidoverview.jsp](http://www.hcup-us.ahrq.gov/kidoverview.jsp). [podaci preuzeti 03.04.2014].
143. Hoerger TJ, Wittenborn JS, Sequel JE, et al. A health policy model of CKD: 2. The cost-effectiveness of microalbuminuria screening. *Am J Kidney Dis* 2010;55:463-4.
144. Grosse SD. Assessing cost-effectiveness in healthcare: history of the \$50,000 per QALY threshold. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes* 2008;Res 8:165–78.
145. Drummond MF, Sculpher MJ, Torrance GW, O'Brien BJ, Stoddart GL. *Methods for the Economic Evaluation of Health Care Programmes*. Oxford: Oxford University Press, 2005.
146. Briggs A, Claxton K, Sculpher M. *Decision modelling for health economic evaluation*. New York, NY: Oxford University Press, 2006.
147. Staples AO, Greenbaum LA, Smith JM, et al. Association between clinical risk factors and progression of chronic kidney disease in children. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:2172–9.
148. U.S. renal data system, USRDS. *Annual data report: Atlas of end-stage renal disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2005.
149. Samuel SM, Tonelli MA, Foster BJ, Alexander RT, Nettel-Aguirre A, Soo A, et al. Survival in pediatric dialysis and transplant patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:1094-9.

150. Centers for Disease Control and Prevention. Available at: [http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr62/nvsr62\\_07.pdf](http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr62/nvsr62_07.pdf). [podaci preuzeti 07.06.2014.]
151. Price list, St. John Hopkins hospital. Available at: <http://pathology.jhu.edu/department/services/ResearchPricing.cfm>. [podaci preuzeti 24.04.2015.]
152. R&D systems. Available at: [www.rndsystems.com](http://www.rndsystems.com). [podaci preuzeti 24.04.2014.]
153. U.S. Renal Data System, USRDS. Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2006.
154. Yen EF, Hardinger K, Brennan DC, Woodward RS, Desai NM, Crippin JS, et al. Cost-effectiveness of extending Medicare coverage of immunosuppressive medications to the life of a kidney transplant. *Am J Transplant* 2004;4:1703-8.
155. Nguyen MT, Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol* 2008;23:2151-7.
156. Berger T, Togawa A, Duncan GS, et al. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:1834-9.
157. Coca SG, Parikh CR. Urinary Biomarkers for Acute Kidney Injury: Perspectives on Translation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:481-90.
158. Fontanilla J, Han WK. Kidney injury molecule-1 as an early detection tool for acute kidney injury and other renal diseases. *Expert Opin Med Diagn* 2011;5:161-73.
159. Han WK, Waikar SS, Johnson A, et al. Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney Int* 2008;73:863-9.
160. Du Y, Zappitelli M, Mian A, et al. Urinary biomarkers to detect acute kidney injury in the pediatric emergency center. *Pediatr Nephrol* 2011;26:267-74.
161. Psotová J, Zahálková J, Hrbáč J, Šimánek V, Bartek J. Determination of TAC in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports. *Biomed Papers* 2001;145:81-3.

162. Hamed E, El-Abaseri T, Mohamed A, Ahmed A, El-Metwally T. Hypoxia and oxidative stress markers in pediatric patients undergoing hemodialysis: cross section study. *BMC Nephrology* 2012;13:136.
163. Bennett RT, Mazzaccaro RJ, Chopra N, et al. Suppression of renal inflammation with vitamins A and E in ascending pyelonephritis in rats. *J Urol* 1991;161:1681-4.
164. Kavukçu S, Soylu A, Türkmen M, et al. The role of vitamin A in preventing renal scarring secondary to pyelonephritis. *BJU Int* 1999;83:1055-9.
165. Gupta R, Verma I, Sharma S, et al. Prevention of tissue injury in an ascending mouse model of chronic pyelonephritis—role of free radical scavengers. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27:225-34.
166. Huang A, Palmer LS, Hom D, et al. Ibuprofen combined with antibiotics suppresses renal scarring due to ascending pyelonephritis in rats. *J Urol* 1999;162:1396-8.
167. Kucuk HF, Bingul SM, Kurt N, et al. Effect of a selective cyclooxygenase 2 inhibitor on renal scarring. *Eur Surg Res* 2006;38:451-7.
168. Poli G, Parola M. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 1997;22:287–305.
169. Bakr A, Hassan SA, Shoker M, Zaki M, Hassan R. Oxidant stress in primary nephrotic syndrome: does it modulate the response to corticosteroids? *Pediatr Nephrol* 2009;24:2375–80.
170. Waikar SS, Liu KD, Chertow GM. Diagnosis, epidemiology, and outcomes of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:844–61.
171. Goldstein SL, Devarajan P. Acute kidney injury in childhood: should we be worried about progression to CKD? *Pediatr Nephrol* 2011;26:509–22.
172. Warady BA, Chadha V. Chronic kidney disease in children: the global perspective. *Pediatr Nephrol* 2007;22:1999–2009.
173. Kramer A, Stel VS, Tizard J, et al. Characteristics and survival of young adults who started renal replacement therapy during childhood. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:926–33.
174. Parikh CR. A point-of-care device for acute kidney injury: a fantastic, futuristic, or frivolous “measure”? *Kidney Int* 2009;76:8-10.

## **BIOGRAFIJA**

Stanislava Petrović je rođena 7. juna 1976. godine u Beogradu, Srbija. Na Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala se školske 1995/1996 godine, a diplomirala je na smeru diplomirani farmaceut-medicinski biohemičar 4. jula 2003. godine, sa prosečnom ocenom 9,28.

Jednogodišnji pripravnički staž obavila je u biohemijskoj laboratoriji Doma zdravlja “Stari grad”, a stručni ispit je položila 2004. godine. Višegodišnje radno iskustvo (u periodu od 2005. do 2013. godine) stekla je u biohemijskim laboratorijama DZ “Stari grad”, “Hexalab” i “Beo-lab”. Od 1. septembra 2014. godine je zaposlena u privatnoj biohemijsko-mikrobiološkoj laboratoriji “Nova Laboratorije”.

Specijalističke akademske studije iz oblasti Farmakoekonomija i farmaceutska legislativa je upisala školske 2009/2010 godine na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, a specijalistički ispit sa temom “Ekonomska evaluacija dijagnostičkih modela za skrining tromboze dubokih vena” je položila 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,50. Poslediplomske doktorske studije na predmetu Medicinska biohemija, Stanislava Petrović je upisala školske 2010/2011 godine na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

## **OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE**

### **Radovi u međunarodnim časopisima**

1. **Petrovic S**, Bogavac-Stanojevic N, Peco-Antic A, Ivanisevic I, Kotur-Stevuljevic J, Paripovic D, Sopic M, Jelic-Ivanovic Z. Clinical application neutrophil gelatinase-associated lipocalin and kidney injury molecule-1 as indicators of inflammation persistence and acute kidney injury in children with urinary tract infection. *BioMed Research International* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/947157>. IF za 2013. godinu 2,706 (M22).
2. **Petrovic S**, Bogavac-Stanojevic N, Kotur-Stevuljevic J, Peco-Antic A, Ivanisevic I, Ivanisevic J, Paripovic D, Jelic-Ivanovic Z. Oxidative status parameters in children with urinary tract infection. *Biochemia Medica* 2014;24(2):266–72. IF za 2014. godinu 2,667 (M21).
3. **Petrovic S**, Bogavac-Stanojevic N, Lakic D, Peco-Antic A, Vulicevic I, Ivanisevic I, Kotur-Stevuljevic J, Jelic-Ivanovic Z. Cost-effectiveness analysis of acute kidney biomarkers in pediatric cardiac surgery. *Biochemia Medica* 2015;25(2):262–71. IF za 2014. godinu 2,667 (M21).

### **Radovi saopšteni u izvodu na međunarodnim naučnim skupovima**

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



## Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Потписани-а: Станислава Петровић  
број уписа: 13/10

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Дијагностички и економски значај одређивања биомаркера акутног оштећења  
бубрега код деце

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 02.11.2015



## Прилог 2.

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Станислава Петровић

Број уписа: 13/10

Студијски програм: медицинска биохемија

Наслов рада: Дијагностички и економски значај одређивања биомаркера акутног оштећења бубрега код деце

Ментор: Проф др Наташа Богавац-Станојевић

Потписани Станислава Петровић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 02.11.2015



## Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Дијагностички и економски значај одређивања биомаркера акутног оштећења бубрега код деце

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 02.11.2015

