

# УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

## МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

### КРАГУЈЕВАЦ

#### 1. Одлука Изборног већа

Одлуком Изборног већа Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу бр. 01-3497/3-9 од 18.05.2011.године именовани су чланови комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата прим др. Виолете Рабреновић под називом :

**„Дијагностички значај одређивања нивоа липокалина удруженог са неутрофилном гелатиназом у урину код болесника са лупус нефритисом ”**

На основу одлуке Изборног већа , формирана је Комисија у саставу:

1. **Проф. др Зоран Ковачевић**, редовни професор Војномедицинске Академије у Београду за ужу научну област интерна медицина, председник
2. **Доц. др Дејан Петровић**, доцент Медицинског факултета, Универзитета у Крагујевцу за ужу област интерна медицина, члан
3. **Проф. др Нада Пејновић**, ванредни професор Медицинског факултета, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан

#### 2.1.Кратка биографија кандидата :

Примаријус др. Виолета Рабреновић рођена је 10.09.1963 године у Словењградецу (Словенија). Дипломирала је на Медицинском факултету у Београду 30.08.1988 год са просечном оценом 8,43. Две године је радила као лекар опште медицине у Дому здравља у Приштини (Служба хитне помоћи), а након тога добија специјализацију у Војномедицинској Академији. Специјалистичке студије из опште интерне медицине завршила је у ВМА и положила специјалистички испит са одличном оценом 26.09.1997 године. Након положеног испита почела је да ради у Клиници за нефрологију ВМА где се и сада налази. У оквиру усавршавања овладала је свим аспектима клиничке нефрологије, трансплантације бубрега, перитонеумске дијализе и хемодијализе. Такође овладала је техником ултразвучне дијагностике

и завршила је Југословенску Школу ултразвука у Крагујевцу 2001 године, Школу хемодијализе и Школу трансплантације Универзитета у Београду.

Положила је субспецијалистички испит из нефрологије 2006 године у Војномедицинској Академији. 2004 године одлуком Министарства здравља додељена јој је титула Примаријуса. До сада је активно учествовала у раду више конгреса и симпозијума из нефрологије у земљи и у иностранству. Члан је Српског Лекарског друштва, Нефролошке секције СЛД, Удружења нефролога Србије, а такође и Европске асоцијације нефролога (ЕРА, ЕДТА).

До сада је објавила више од двадесет ауторских и више од педесет коауторских радова који су публиковани у националним или страним часописима, зборницима у целини или у виду сажетака, а неки од њих су и саопштени на значајним скуповима у земљи и у иностранству.

## **2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе**

**Наслов:** „Дијагностички значај одређивања нивоа липокалина удруженог са неутрофилном гелатиназом у урину код болесника са лупус нефритисом”

**Предмет:** Ова студија ће се бавити утврђивањем нивоа биомаркера липокалина удруженог са неутрофилном гелатиназом у урину (НГАЛ /у) код болесника са лупус нефритисом који је у фази стабилне ремисије и у фази акутне болести, Поређењем са другим параметрима утврдитће се колико је НГАЛ /у, осетљивији показатељ погоршања болести односно активности лупус нефритиса и на тај начин би омогућио рану детекцију бубрежног оштећења.

### **Хипотезе:**

- Повећана концентрација НГАЛ у урину болесника са лупус нефритисом је рани биомаркер активности болести и погоршања бубрежне функције
- Промена концентрације НГАЛ у урину болесника са лупус нефритисом је поуздан параметар повољног ефекта примењеног лечења

## **2.3. Подобност кандидата**

Кандидат примаријус др. Виолета Рабреновић испуњава све услове предвиђене Законом о Универзитету (члан 57) и Статутом Факултета (члан 22) за израду докторске дисертације.

Анализом објављених радова кандидаткиње прим др Виолете Рабреновић уочава се мултидисциплинарни приступ. Комисија констатује да се ради о истраживачу који је свој истраживачки потенцијал показао кроз 27 ауторских и 57 коауторских радова. Пријављена тема је предмет интересовања кандидата у дужем временском периоду.

## Подаци о објављеним радовима:

Кандидату је објављен један рад у целини за штампу у водећем националном часопису, у коме је први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе:

1. **Rabrenović V**, Kovačević Z, Jovanović D, Rabrenović M, Dimitrijević J, Škatarić V, Popović D, Abugras S. **Mikroskopski poliangitis**. *Vojnosanit Pregl* 2001; 58(3): 323-328. **M51 – 1.5 бод**

## 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Системски еритемски лупус (СЛЕ) је аутоимуно, мултисистемско обољење хроничног тока и недовољно познате етиологије, које се одликује масивном продукцијом поликлонских аутоантитела, активацијом комплемента, депозитима имунских комплекса, оштећењем и дисфункцијом скоро сваког органа и ткива. Када болест у својој прогресији захвати бубреге долази до испољавања најтеже клиничке слике – лупус нефритиса (ЛН). Болесници са ЛН се лече дуготрајно и веома пажљиво због склоности ка релапсима и егзацербацијама. Досадашњи биохемијски параметри одређивања активности болести су недовољни а њихова корист контроверзна. Зато је у пракси златни стандард за одређивање активности ЛН биопсија бубрега. Да би праћење било успешно није довољно учинити једну биопсију бубрега. Међутим серијске биопсије бубрега којима би пратили активност болести, успешност лечења, као и поновну појаву активације болести се рутински не користе у клиничкој пракси из много разлога: метода је болна, некомфорна за пацијента, има потенцијалне компликације. Из свакодневне праксе у току праћења пацијената и без биопсије бубрега могуће је утврдити знаке активности болести који су уједно и лоши прогностички знаци ЛН (пораст серумског креатинина, изражена протеинурија, налаз активног седимента урина). Последњих година запажено је да стандардно праћење бубрежне функције коришћењем серумског креатинина није адекватно јер значајна оштећења бубрега настају пре функционог оштећења и пре него што дође до пораста креатинина у серуму .

Нову наду да се на једноставан и комфоран начин у свакодневној пракси за болесника са ЛН може благовремено уочити активност болести и на тај начин превенирати и успорити прогресија болести представљају уринарни биомаркери.

НГАЛ или Neutrophil gelatinase– associated lipocalin (такође познат и као : lipokain 2, Siderocalin) је протеин тежине 25 kDa, ковалентно везан за желатиназу из неутрофила. Он је

један од најпотентнијих регулаторних протеина у експерименталном моделу акутног бубрежног оштећења .

Ранијих година студије прво у дечијој популацији, а касније и код одраслих су показале да је развоју акутне бубрежне инсуфицијенције у јединицама интензивне неге претходило вишеструко повећање концентрације уринарног НГАЛ у односу на контролну групу.

Мерењем нивоа НГАЛ у урину и у плазми, након кардиохируршких интервенција доказано је да је он рани показатељ бубрежног оштећења . Након исхемијско–реперфузијског оштећења, код деловања нефротоксичних супстанци, у сепси, бубрег реагује већ у првих 30 минута излучујући преко епителних ћелија тубула велике количине НГАЛ .

Све ово било је разлог да се НГАЛ назове и бубрежним "тропонином" као алузија на улогу тропонина као дијагностичког и прогностичког параметра у акутном коронарном синдрому . При томе сматра се да је уринарни НГАЛ много сензитивнији показатељ акутног бубрежног оштећења од серумског НГАЛ јер се појављује раније. У поређењу са серумским креатинином 1-3 дана пре пораста креатинина указује на акутну лезију бубрега.

Одређивање нивоа НГАЛ као параметра акутног бубрежног оштећења је према неким студијама значајно и у трансплантацији бубрега. Протоколарне биопсије бубрега учињене 1 сат након постављања васкуларне анастомозе указују на значајну корелацију између НГАЛ и појаве одложене функције графта . У проспективној мултицентричној студији код деце и одраслих ниво уринарног НГАЛ у узорцима урина прикупљеним на дан трансплантације идентификовали су пацијенте који су касније развили одложену функцију графта ( а која се испољила након 2-4 дана). Према појединим ауторима НГАЛ је добар биомаркер и хроничног бубрежног обољења имајући у виду да ниво у плазми корелира са гломерулском филтрацијом боље од серумског креатинина. Код болесника са хроничном бубрежном инсуфицијенцијом у оквиру гломерулонефритиса, ниво уринарног НГАЛ корелираће са серумским креатинином, ГФР и протеинуријом. Посебну потешкоћу у лечењу лупус нефритиса представљају релапси и егзацербације па је идентификација биомаркера који би био показатељ погоршања болести а уједно и био једноставан за одређивање у свакодневној пракси био велики изазов за истраживаче. Рана идентификација активне болести смањила би дугорочни морбидитет и морталитет што свакако има велики значај како медицински тако и социоекономски. Уринарни НГАЛ би могао бити потенцијални показатељ погоршања односно активности лупус нефритиса који би омогућио рану детекцију и одредио степен бубрежног оштећења. Сматра се да је сензитивнији показатељ у поређењу са титром анти дс-ДНК. Досадашња испитивања код деце указала су да је ниво уринарног НГАЛ и добар параметар стабилне ремисије лупус

нефритиса. Све су ово новија сазнања која би морала бити поткрепљена студијама код одраслих болесника са лупус нефритисом код којих би била искључена потенцијална бубрежна слабост и њен утицај на ниво уринарног НГАЛ и рану детекцију активности болести.

## **2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области**

**Значај истраживања :** Резултати ове тезе ће у пракси омогућити прецизније дијагностиковање активности лупус нефритиса и у складу са тим адекватнији терапијски модалитет тј. промену протокола лечења, дужину терапије, смањење дозе лекова, смањење потенцијалних токсичних ефеката лекова. Могућност да индивидуализујемо лечење наших болесника је пут ка најоптималнијем учинку лечења.

**Циљ истраживања :** Одредити концентрацију у/ НГАЛ код болесника са лупус нефритисом који су у ремисији болести, одредити концентрацију у/НГАЛ код болесника са активним лупус нефритисом, пре и након 2 и 4 месеца по започињању лечења када се очекују промене активности болести, упоредити параметре активности болести и концентрације у/НГАЛ код болесника у ремисији болести (контролна група) и код болесника са активном болешћу (испитивана група), упоредити параметре активности болести и погоршања бубрежне функције са концентрацијама у/НГАЛ код болесника у испитиваној групи пре и након 2 и 4 месеца по започињању лечења када се очекују промене активности болести, утврдити клинички статус болесника обе групе у односу на параметре активности болести и бубрежне функције и концентрације у/НГАЛ.

## **2.6 Веза истраживања са досадашњим истраживањима**

На основу ранијих судија утврђено је да је НГАЛ /у рани показатељ бубрежног оштећења у исхемијско-реперфузијским стањима, у развоју сепсе, приликом дејства нефротоксичних супстанци /контрастна снимања, хемиотерапије/. Такође запажено је да пораст нивоа НГАЛ/у претходи порасту стандардних параметара бубрежне функције који се прате и да је зато он добар прогностички параметар. Према неким ауторима због тога је и назван бубрежни "тропонин". Његов пораст у урину јавља се око 72 часа пре пораста серумског креатинина ( а самим тим и запажања развоја акутне бубрежне инсуфицијенције). Сличне студије учињене су и код болесника са трансплантираним бубрегом где пораст НГАЛ /у серуму и у урину, упућује на исхемијска оштећења, развој одложене функције графта односно акутне тубулске некрозе ( АТН). Досадашња испитивања код деце су указала да је ниво уринарног НГАЛ код оболелих

са лупус нефритисом сензитивнији параметар у процени активне болести од дс ДНА . Такође испитивања код деце су показала да је НГАЛ сензитиван и у одређивању стабилне ремисије болести. Ова сазнања би морала бити поткрепљена студијама код одраслих болесника са лупус нефритисом код којих би одређивањем НГАЛ у урину могли да на веома једноставан начин рано детектујемо активност болести при чем била искључена бубрежна слабост и њен утицај на ниво уринарног НГАЛ.

## 2.7. Методе истраживања

Ова клиничка проспективна студија ће обухватити око 40 болесника са системским еритемским лупусом (СЕЛ), потврђеним АРА критеријумима и Лупус нефритисом(ЛН) потврђеним биопсијом бубрега и патохистолошким налазом (према СЗО класификацији), оба пола и различите старосне доби (старији од 18 година).

Активност бубрежне болести класификовала би се према Индексу активности бубрежне болести (СЛЕДАИ/р ). СЛЕДАИ/р (renal Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-rSLEDAI). се састоји од 4 критеријума који степењују бубрежно оштећење у СЛЕДАИ 2000 (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-SLEDAI 2000) критеријумима активности СЕЛ .Овај индекс укључује хематурију (>5 еритроцита у видном пољу великог увећања), пиурију (>5 леукоцита у видном пољу великог увећања), протеинурију (>0.5 г/24ч или однос уринарних протеина / креатинин >0.5) и цилиндрурију (гранулирани, еритроцитни, хијалини). Ако је присутан неки од ових параметара означава се резултатом 4 а скор реналне активности је од 0-16.Као укључујући критеријум сматраће се сваки скор активности већи од >0.

Студија ће укључити групе болесника према јасним критеријумима:

*Контролна група:* 20 болесника са СЕЛ и ЛН који је у комплетној ремисији (према критеријуму - да је протеинурија  $\leq 0,5$  г/24ч, уз негативна анти - дс ДНА антитела, Ц3,Ц4, и са клиренсом креатинина  $\geq 60$  мил/мин.

*Испитивана група :* 20 болесника са СЕЛ и ЛН код којих је болест активна / критеријум за активност болести према стандардним биохемијским анализама протеинурија  $\geq 1,5$ г/24ч , са сниженим Ц3, Ц4, позитивним анти дс ДНА и патохистолошким налазом биопсије бубрега као и према р/ СЛЕДАЛ критеријумима , без бубрежне инсуфицијенције или са бубрежном инсуфицијенцијом 2. степена тј. са клиренсом креатинина  $\geq 60$  мил/мин.

Пратио би се и поредио однос параметара између контролне и испитиване групе на почетку лечења, контролне и испитиване групе током промена активности болести а које се очекују 2 и

4 месеца по започињању лечења, а у моменту одређивања у/НГАЛ независна група колега – нефролога са клинике ће на основу свих предвиђених параметара, без увида у резултате у/НГАЛ, проценити активност болести. Такође у очекиваном термину промене активности болести /2-ги и 4-ти месец/ пратили би се и поредили и други параметри активности болести испитиваних група. Параметри који би се пратили у свакој визити били би стандардни биохемијски параметри и параметри бубрежне функције : Ц реактивни протеин, крвна слика, уреа, креатинин, укупни протеини, албумини, холестерол, триглицериди, цистатин Ц, ГФР (МДРД), клиренс креатинина по Кокрофту као и имунске анализе : ЦЗ, Ц4, ЦХ50, АНА ( ХЕП 2 субстрат), анти дс ДНА антитела. Анализе урина: седимент урина, протеинурија по Биурету. уринокултура .Студија би обухватила три визите иницијалну, након 2 и 4 месеца по започињању лечења. Поред рутинских клиничко лабораторијских испитивања у време сваке посете, код сваког пацијента би се искључиво у узорку првог јутарњег урина који је претходно центрифугиран у центрифуги на 4000 обртаја / мин, ( због уклањања талога) методом ЦМИА - хемилуминесцент имуноесеј технологијом –која представља имунохемијски тест одређивао уринарни НГАЛ ( комерцијални китови фирме : Abbott Diagnostic на ARCHITECT® i2000 SR аналајзеру. Титар уринарног НГАЛ биће изражаван у ng/ml, при чему би горњу референтну границу представљао ниво од 131,7 ng/ml.

*Искључујући критеријуми* за студију били би: болесници млађи од 18 година, болесници са уринарном инфекцијом (позитивна уринокултура), са бубрежном инсуфицијенцијом ( кл креатинина < 60мил/мин / по Кокрофту).

*Снага студије и величина узорка*

Пошто снага студије треба да буде 80%, вероватноћа грешке првог типа ( $\alpha = 0.05$ ) и пошто ће се разлика између група утврђивати путем t- теста, а узимајући у обзир да је очекивана разлика концентрација уринарног НГАЛ између група око 50% са стандардном девијацијом  $\approx \pm 30\%$ , произилази да је потребан број пацијената минимално 17 у свакој групи.

*Статистичка обрада података*

Сви резултати у тексту и у табелама и графиконима биће приказани као средња вредност и стандардна девијација (СД). Статистичка значајност одређиваће се Студентовим t тестом или У тестом. Значајност разлика дистрибуција фреквенција појединих обележја биће утврђена применом  $\chi^2$  теста. У циљу анализе значајности разлика између појединих параметара биће установљена три нивоа статистичке значајности ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ). Биће конструисане РОК кривуље за НГАЛ и одређене граничне вредности на основу израчунатих вредности за

специфичност и сензиивност. Статистичка обрада података биће извршена помоћу комерцијалног статистичког софтвера за РС рачунаре (Stat for Windows R 4.5 SAD).

## **2.8 Очекивани резултати докторске дисертације**

Резултати студије ће показати присуство значајне корелације између уринарног НГАЛ као веома сензитивног параметра активности болести у односу на стандардне лабораторијске и имунске анализе. Корелација НГАЛ у урину и активности болести тј. тежине клиничке слике представља добар прогностички параметар у току лечења. Ако се потврди постављена хипотеза, истраживање би показало да се коришћењем тестова за одређивање уринарног биомаркера НГАЛ код болесника са лупус нефритисом смањује значај биопсије бубрега у постављању дијагнозе и у евалуацији ефекта лечења. Мониторинг активности болести уз биомаркере би свакако имао предност у свакодневној пракси. На тај начин у току лечења ЛН уз серијско праћење биомаркера НГАЛ лекари би имали могућност за оптимизацију лечења (мање дозе, мањи потенцијално токсични ефекат),измене модалитета а самим тим и бољу прогнозу болести.

## **2.9. Оквирни садржај дисертације**

Прелиминарни подаци из многобројних објављених студија су указали да постоји корелација уринарног биомаркера НГАЛ са лезијом бубрега која је настала у току исхемијског, токсичног, инфективног или другог штетног деловања на бубреге. Оно сшто су описали многи аутори односи се на сензитивност биомаркера НГАЛ у поређењу са другим параметрима бубрежне лезије који се рутински користе. Уринарни НГАЛ указује на настанак лезије бубрега око 72сата пре него што запазимо пораст креатинина у лабораторијским анализама. Код болесника са хроничном бубрежном инсуфицијенцијом у оквиру гломерулонефритиса, ниво уринарног НГАЛ корелира са серумским креатинином, ГФР и протеинуријом. Посебну потешкоћу у лечењу лупус нефритиса представљају релапси и егзацербације па је идентификација биомаркера који би био показатељ погоршања болести а уједно и био једноставан за одређивање у свакодневној пракси био велики изазов за истраживаче. Сматра се да је сензитивнији показатељ у поређењу са титром анти дс-ДНК. Досадашња испитивања код деце указала су да ниво урунарног НГАЛ је и добар параметар стабилне ремисије лупус нефритиса,м Циљ студије је одредити концентрацију у/ НГАЛ код болесника са лупус



нефритисом који су у ремисији болести и који су са активним лупус нефритисом, пре и након 2 и 4 месеца по започињању лечења. Такође обавиће се поређење параметра активности болести и концентрације у/НГАЛ у обе групе, у периоду од 2 и 4 месеца лечења. Резултати би нам показали присуство значајне корелације између уринарног НГАЛ као веома сензитивног параметра активности болести у односу на стандардне лабораторијске и имунске анализе. Корелација НГАЛ у урину и активности болести тј. тежине клиничке слике представља добар прогностички параметар у току лечења.

## **2.10. Име ментора**

**Проф др Зоран Ковачевић**, редовни професор Војномедицинске Академије у Београду за ужу научну област Интерна медицина – нефрологија. Проф др Зоран Ковачевић поседује стручне и научне компетенције које су комплементарне са предметом истраживања и планираном методологијом.

## **2.11. Научна област дисертације**

Медицина. Предложена тема је мултидисциплинарна из области нефрологије, реуматологије, биохемије.

## **2.12 Научна област чланова комисије**

- 1. Проф др Зоран Ковачевић**, редовни професор Војномедицинске Академије у Београду, за ужу научну област Интерна медицина – нефрологија, председник
- 2. Доц др Дејан Петровић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу област интерна медицина- нефрологија, члан
- 3. Проф др Нада Пејновић**, ванредни професор Медицинског факултета, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан

## ЗАКЉУЧАК

Комисија је прихватила предлог усвојен на седници Изборног Већа а у вези корекције наслова теме из " Терапијски и прогностички значај одређивања уринарног биомаркера - NEUTROFIL GELATINASA - ASSOCIATED LIPOCALIN (NGAL) код болесника са системским еритемским лупусом и лупус нефритисом" у " Дијагностички значај одређивања нивоа липокалина удруженог са неутрофилном гелатиназом у урину код болесника са лупус нефритисом."

Такође сугестија Комисије за јавну одбрану дизајна и снаге студије је усвојена и учињена је потребна процена довољног броја болесника за успостављање статистички значајне РОЦ криве у циљу одређивања cut –off вредности новог маркера који се испитује у студији а усвојена је и сугестија да се време мерења нивоа маркера повеже са активношћу болести.

1. На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих радова кандидат прим др Виолета Рабреновић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Тема докторске дисертације је добро конципирана актуелна и процењени резултати могли би значајно допринети у лечењу лупус нефритиса .
3. Дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна; предвиђен је одговарајући број болесника који ће бити клинички и лабораторијски обрађени применом савремених метода, а добијени резултати обрађени одговарајућим статистичким методама.
4. Комисија предлаже Научно-наставном већу Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата Прим.др. Виолете Рабреновић под називом: **"Дијагностички значај одређивања нивоа липокалина удруженог са неутрофилном гелатиназом у урину код болесника са лупус нефритисом"** и кандидату одобри израду докторске дисертације и одлуку о одобрењу упути на даљи поступак стручном органу Универзитета .

**Чланови комисије:**

- 1. Проф. др Зоран Ковачевић**, редовни професор Војномедицинске Академије у Београду за ужу научну област интерна медицина, председник
- 

- 2. Доц. др Дејан Петровић**, доцент Медицинског факултета, Универзитета у Крагујевцу за ужу област интерна медицина, члан
- 

- 3. Проф. др Нада Пејновић**, ванредни професор Медицинског факултета, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан
- 

Београд, 25.09.2011 год